



Cláudia Isabel Métodos Espectroscópicos para o Estudo da
Rodrigues de Almeida Cerveja



**Cláudia Isabel
Rodrigues de Almeida**

**Métodos Espectroscópicos para o Estudo da
Cerveja**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química e Qualidade dos Alimentos, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor António de Sousa Barros, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da Bruker BioSpin
GmbH, Alemanha.

À cidade de Aveiro e a tudo o que ela significa para mim...

O júri

Presidente

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Doutor Timothy Hogg
Professor Associado da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa,
Porto

Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil (orientadora)
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Doutor António César da Silva Ferreira
Investigador da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, Porto

Doutor António de Sousa Barros (co-orientador)
Investigador Auxiliar da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Gostaria de expressar um especial e sincero agradecimento à Doutora Ana Gil e ao Doutor António Barros, orientadores deste trabalho, pela disponibilidade revelada para a discussão e esclarecimento de quaisquer dúvidas, bem como, o empenho, dedicação e disponibilidade demonstradas.

À Iola Duarte, agradeço toda a partilha de conhecimentos, colaboração e amizade.

Agradeço também ao Doutor Manfred Spraul, que acreditou no meu trabalho e o tornou possível, devido ao apoio financeiro concedido.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio da UNICER, Bebidas de Portugal, S.A., mais propriamente da Dra. Cristina Gonçalves e Eng^a Maria Manuel Dantas, que tão gentilmente cederam algumas das amostras para o estudo em questão e ajudaram a interpretar os resultados.

Agradeço igualmente a todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Química Alimentar, assim como a todos os colegas do Mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos, especialmente à Sónia Regina, à Filomena, à Carla, ao Gonçalo e ao Nuno, pelo apoio constante, abertura à discussão e amizade.

Um especial agradecimento à Andreia Dias, pela sua amizade e pelo apoio incondicional.

A todos os meus amigos de Aveiro, pela compreensão, apoio e ânimo que foram transmitindo ao longo destes anos, em especial à Joana, à Bárbara e à Teresa; sem eles teria sido bem mais difícil.

Aos meus pais por me terem apoiado com todo o seu carinho e compreensão durante toda esta caminhada.

Ao Rui, o reconhecimento pelo seu apoio nos momentos mais difíceis, a sua compreensão e acima de tudo o seu amor.

Palavras-chave

cerveja, origem, controlo de qualidade, RMN, FTIR, espectroscopia, análise multivariada

Resumo

O trabalho apresentado nesta dissertação pretendeu desenvolver e aplicar métodos espectroscópicos, em especial, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), acoplados com a análise em componentes principais (PCA), na caracterização química da cerveja e consequente correlação com variáveis, tais como, origem/local (país ou cidade) e data de produção.

No capítulo 1 estão apresentados os vários objectivos deste trabalho enquanto que no capítulo 2 (Introdução Geral) se descrevem a origem, o processo de fabrico e a composição química da cerveja, assim como os fundamentos dos métodos usados.

No capítulo 3 mostram-se os resultados da aplicação da espectroscopia de RMN no estudo da composição química da cerveja. O espectro de RMN de ^1H apresenta elevada complexidade e contém informação sobre uma vasta gama de compostos. Recorrendo a espectros bidimensionais é possível identificar vários compostos, incluindo açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos.

No capítulo 4 apresenta-se um estudo sobre a determinação da origem e data de produção de cervejas produzidas em diferentes países. A espectroscopia de FT-IR e a PCA permitiram distinguir algumas cervejas com base no seu teor alcoólico e conteúdo em maltose e dextrinas. Por sua vez, a espectroscopia de RMN acoplada com a PCA detectou compostos (e.g. ácido pirúvico, láctico e dextrinas) que possibilitam a separação por país de origem e data de fabrico. No capítulo 5 são descritos os resultados da aplicação das mesmas metodologias, mas em cervejas produzidas num mesmo país. Pretendeu-se averiguar se um controlo mais efectivo das diferentes variáveis (qualidade da água, tipo de matérias-primas, condições ambientais e tipo de equipamento) pode ainda provocar diferenças na composição química da cerveja. Não foi encontrada uma separação clara entre os locais de fabrico, nem por espectroscopia de FT-IR nem por RMN. No entanto, esta última permitiu a distinção entre algumas cervejas produzidas em datas diferentes. Esta separação deve-se, por exemplo, ao conteúdo em aminoácidos e nucleósidos, que pode estar relacionado com diferentes condições de processamento, estado da levedura e tipo de equipamento.

Finalmente, no capítulo 6 é feita uma abordagem preliminar ao estudo do processo de fabrico da cerveja por espectroscopia de RMN. Esta metodologia poderá ser uma mais valia no controlo de qualidade efectivo e rápido e optimização de processos industriais.

Keywords

beer, origin, quality control, NMR, FTIR, spectroscopy, multivariate analysis

Abstract

The work reported in this thesis aimed at developing and applying spectroscopic methods, mainly nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, in tandem with principal component analysis (PCA), for the thorough chemical characterization of beer and its correlation with variables such as production site (country or town) and date of production.

In chapter 1 the objectives of this work are presented while in chapter 2 (General Introduction) the origins, process of production and general chemical composition of the beer are described, as well as the fundamentals of the methods employed.

Chapter 3 presents the results of the application of high resolution NMR for the characterisation of the chemical composition of beer. The ^1H spectra show a high complexity and contain information about many compounds. Spectral assignment is carried out with basis on 1D and 2D NMR spectra, resulting in the identification of many components, including sugars, amino acids and organic acids.

Chapter 4 presents a study about the determination of production origin and date of beers produced in different countries. FT-IR spectroscopy and PCA allowed to distinguish some beers on basis of its ethanol, maltose and dextrins content. Some compounds (e.g. pyruvic and lactic acids and dextrins) have been detected by NMR spectroscopy and PCA and found to allow the separation of samples by origin country and date of production. In chapter 5, the results of the application of the same methodologies to beers produced nationally are described. Here, the aim was to determine if even though a more effective control of the different variables (water quality, kind of matters, environmental conditions and kind of equipment) is possible, there still are meaningful differences between samples. It wasn't found a clear separation between production sites, neither by FT-IR or NMR spectroscopy. However, NMR spectroscopy allowed the distinction between some beers produced in different dates. It was observed that the differences found relate, for example, to amino acids and nucleosides content, which may be related to variables such as different conditions of processing, yeast age and type and equipment conditions.

Finally, in chapter 6 a preliminary approach to the study of beer production by NMR spectroscopy is made. This methodology could be valuable in the effective and fast quality control and for the industrial processes optimization.

ARTIGOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS COM ARBITRAGEM:

1. Duarte, I.F., Barros, A., Almeida, C., Spraul, M., Gil, A.M., "Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data as a Potential Tool for the Quality Control of Beer", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1031-1038, 2004.
2. Nilsson, M., Duarte, I.F., Almeida, C., Delgadillo, I., Goodfellow, B.J., Gil, A.M., Morris, G.A., "High Resolution NMR and Diffusion Ordered Spectroscopy of Port Wine", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3736-3743, 2004.
3. Almeida, C., Duarte, I.F., Barros, A., Rodrigues, J., Spraul, M., Gil, A.M., "The composition of beer by ^1H NMR spectroscopy: the effects of brewing site and date of production", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 700-706, 2006.

PROCEEDINGS DE CONFERÊNCIAS:

1. Duarte, I.F., Almeida, C., Barros, A., Gil, A.M., "Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data for the Quality Control of Beer", *6th International Conference on Applications of Magnetic Resonance to Food Science*, Paris, France, 2002.
2. Almeida, C., Duarte, I.F., Barros, A., Gil, A.M., "Multivariate analysis of FTIR and NMR data of beer as a potential tool for its quality control", *6^o Encontro de Química de Alimentos*, Lisboa, Portugal, 2003.
3. Almeida, C., Duarte, I.F., Barros, A., Gil, A.M., "Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data of Beer as a Potential Tool for its Quality Control", *2^o ELBRMN*, Sintra, Portugal, 2003.
4. Almeida, C., Duarte, I.F., Barros, A., Gil, A.M., "Application of FTIR and NMR Spectroscopy for the Determination of Origin and Date of Production of Beer", *7th International Conference on Applications of Magnetic Resonance to Food Science*, Copenhagen, Denmark, 2004.
5. Almeida, C., Barros, A., Gil, A.M., "Application of Outer Product-PCA for the characterization of beers by FTIR and NMR Spectroscopy", *CAC-2004, Chemometrics in Analytical Chemistry*, Lisboa, Portugal, 2004.
6. Gil, A.M., Almeida, C., Duarte, I.F., Barros, A., Gonçalves, C., Ferreira, A.A., "Application of NMR spectroscopy for the quality control of beer", *30th International EBC Congress*, Praga, República Checa, *30th International European Brewing Convention (EBC) Congress*, Fachverlag Hans Carl, Netherlands, 2005.

Índice

1	Objectivos.....	5
2	Introdução Geral.....	7
2.1	<i>A Origem e o Processo de Fabrico da Cerveja.....</i>	8
2.2	<i>Composição Química e Propriedades da Cerveja</i>	16
2.2.1	Compostos Responsáveis pela Espuma, Cor e Turvação da Cerveja	16
2.2.2	Compostos Responsáveis pelo Sabor e Aroma da Cerveja.....	20
2.3	<i>Fundamentos dos Métodos Usados.....</i>	27
2.3.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	27
2.3.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Alta Resolução	31
2.3.3	Análise em Componentes Principais (PCA).....	37
	Referências.....	39
3	Estudo da Composição Química da Cerveja por Espectroscopia de RMN	43
3.1	<i>Introdução.....</i>	44
3.2	<i>Materiais e Métodos.....</i>	45
3.3	<i>Análise dos Espectros de RMN 1D e 2D.....</i>	46
3.4	<i>Conclusões</i>	53
	Referências.....	53
4	Determinação do País e Data de Fabrico de Cervejas Produzidas Internacionalmente.....	57
4.1	<i>Introdução.....</i>	58
4.2	<i>Materiais e Métodos.....</i>	60
4.3	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de FT-IR.....</i>	63
4.4	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN.....</i>	66
4.5	<i>Conclusões</i>	89
	Referências.....	91
5	Determinação do Local e Data de Fabrico de Cervejas Produzidas no mesmo País.....	95
5.1	<i>Introdução.....</i>	96
5.2	<i>Materiais e Métodos.....</i>	96

5.3	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de FT-IR</i>	98
5.4	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN</i>	100
5.5	<i>Conclusões</i>	115
	Referências.....	116
6	Aplicação da Espectroscopia de RMN ao estudo do Processo de Fabrico da Cerveja.....	119
6.1	<i>Introdução</i>	120
6.2	<i>Materiais e Métodos</i>	121
6.3	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN</i>	122
6.4	<i>Conclusões</i>	134
	Referências.....	135
7	Conclusões Finais e Propostas de Trabalho Futuro	139

Abreviaturas e Símbolos

Abs	Absorvância
ATR	Reflexão Total Atenuada (“Attenuated Total Reflection”)
DMS	Sulfeto de dimetilo (“Dimethyl sulfide”)
DOSY	“Diffusion-Ordered Spectroscopy”
FID	Decaimento Livre Induzido (“Free Induction Decay”)
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier (“Fourier Transform Infrared”)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (“ γ -Aminobutyric Acid”)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (“High-Performance Liquid Chromatography”)
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Correlation”
INEPT	“Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer”
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LB	“Line Broadening”
LC	Cromatografia Líquida (“Liquid Chromatography”)
MLEV-17	“Malcom Levitt’s Composite-pulse Decoupling Sequence”
MS	Espectrometria de Massa (“Mass Spectrometry”)
PC	Componente Principal (“Principal Component”)
PCA	Análise em Componentes Principais (“Principal Components Analysis”)
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNIF	“Site-specific Natural Isotope Fractionation”
TOCSY	“Total Correlation Spectroscopy”
TSP	3-(trimetilsilil)-propionato-2,2,3,3- d_4 de sódio (“sodium 3-(trimethylsilyl)-propionate”)
U.A.	Unidades Arbitrárias
VDK	Dicetonas Vicinais (“Vicinal DiKetones”)

1 OBJECTIVOS

Pretende-se com esta dissertação avaliar o potencial das técnicas espectroscópicas de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (RMN) acopladas com métodos quimiométricos, para a análise de amostras de cerveja, nomeadamente na selecção e identificação de compostos químicos que as possam caracterizar, principalmente a nível qualitativo.

Os principais objectivos foram:

- i) elaborar uma caracterização detalhada da composição química da cerveja por espectroscopia de RMN (1D e 2D);
- ii) estudar a influência da origem/local de fabrico na composição química da cerveja;
- iii) identificar e avaliar as principais variações de composição entre as cervejas produzidas em diferentes datas;
- iv) elaborar um estudo preliminar das variações químicas da cerveja nas diferentes etapas do processo de fabrico da cerveja;
- v) avaliar o potencial da espectroscopia de RMN, acoplada a métodos estatísticos, para aplicação rotineira na indústria, para controlo do produto e do processo.

É cada vez mais premente desenvolver técnicas rápidas de análise que permitam o controlo do processo de fabrico da cerveja, não só para garantir a segurança do consumidor final, como para permitir a optimização dos processos e consequente redução de custos. No entanto, a cerveja é uma mistura complexa e, obviamente, o controlo de qualidade envolve a determinação de muitos parâmetros diferentes. Os métodos de análise padronizados mais tradicionais requerem tempo e, normalmente, envolvem um pré-tratamento da amostra, por exemplo, uma concentração ou uma extracção. Assim, e uma vez que a espectroscopia de FT-IR e RMN são técnicas não destrutivas e que permitem a detecção e quantificação de várias famílias de compostos em simultâneo, em apenas alguns minutos, pretendeu-se aplicar estes métodos, em conjunto com ferramentas multivariadas, no estudo da cerveja. A necessidade destas ferramentas prende-se com o facto de, por um lado, os espectros apresentarem sinais complexos, e por outro, devido ao elevado número de amostras a

analisar, revelando-se inexecutável qualquer tentativa de extrair informação suficiente e útil de todos os dados.

Todavia, a aplicação da espectroscopia de RMN nas indústrias alimentares nacionais ainda não é uma realidade muito frequente, uma vez que os equipamentos representam um esforço económico demasiado elevado e, ao mesmo tempo, porque são necessárias pessoas qualificadas para os operarem. Deste modo, seria importante tornar os métodos mais acessíveis, recorrendo por exemplo, a modelos estatísticos e automação, de forma a garantir a viabilidade técnica e económica numa indústria alimentar.

2 INTRODUÇÃO GERAL

2.1	<i>A Origem e o Processo de Fabrico da Cerveja</i>	8
2.2	<i>Composição Química e Propriedades da Cerveja</i>	16
2.2.1	Compostos Responsáveis pela Espuma, Cor e Turvação da Cerveja	16
2.2.2	Compostos Responsáveis pelo Sabor e Aroma da Cerveja	20
2.3	<i>Fundamentos dos Métodos Usados</i>	27
2.3.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	27
2.3.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Alta Resolução	31
2.3.3	Análise em Componentes Principais (PCA).....	37
	Referências	39

2.1 A Origem e o Processo de Fabrico da Cerveja

“Uns grãos caídos numa pedra esburacada, uma chuva fina, seguida de uns dias tépidos e o milagre da fermentação produz o primeiro dos antecessores do que hoje conhecemos por cerveja”

in O Mundo da Cerveja, 2001

A cerveja tem as suas origens em épocas anteriores à presença do homem sobre a Terra. Milhares de anos depois, já em pleno Neolítico, quando o homem começa a dar os primeiros passos no pastoreio e agricultura, desenvolveram-se lentamente os processos de elaboração da cerveja. Os Sumérios, 5000 anos antes de Cristo, foram os primeiros a impor regras ao fabrico da cerveja. Chamavam-lhe *sikaru* e consideravam-na uma bebida medicinal e sagrada. Os Babilónios que lhes sucederam, deixaram-nos já muitos testemunhos de uma indústria cervejeira florescente. O mesmo acontece relativamente aos Egípcios, onde a cerveja se tornou uma verdadeira bebida nacional; bebiam-na o povo e os reis, era oferecida a deuses, figurava nos tesouros dos sarcófagos notáveis. Na Etiópia, no Norte de África, entre os Gregos e os Persas, a cerveja aparece como bebida corrente, mas foi o domínio romano que a espalhou pela Europa para combater uma grave crise na cultura cerealífera. Através da Gália chega à Grã-Bretanha, à Escandinávia e à Península Ibérica e depressa se torna a bebida favorita dos povos do Norte (União Cervejeira, 1993; O Mundo da Cerveja, 2001).

A origem etimológica da palavra cerveja encontra-se no latim “*cervesia*”, designação específica de bebida fermentada. Os Gauleses chamavam-lhe “*cerevisia*”, provavelmente evocadores de Ceres, deusa das colheitas. O aproveitamento do final verbal da expressão latina “*cervesiam bibere*” deve ter dado origem às palavras que noutras línguas europeias designam a cerveja (*bière*, *bier*, *beer*).

Naturalmente, que a cerveja terá tido, ao longo dos anos, diferentes caracterizações, com o traço comum, de ser uma bebida fermentada, obtida a partir dos cereais. Só no início do século XVI, se precisou na Europa o conteúdo da palavra cerveja – “*bebida constituída pelo cozimento ou infusão de cevada germinada e grãos crus de outros cereais*,

aromatizada pelo lúpulo e fermentada pela acção de leveduras”. Foi porém no século XIX que o fabrico da cerveja recebeu um maior impulso, através da resolução de dois problemas fundamentais: o isolamento das leveduras responsáveis pela fermentação, o que ficou a dever-se a Pasteur, e a possibilidade de manutenção dos tanques de fermentação e as caves de guarda a temperaturas convenientemente baixas, durante todo o ano.

Hoje em dia, a história da cerveja começa com o grão de cevada maduro, saudável, com um tamanho considerável e com um conteúdo de proteínas moderado (para um cereal) de 10-12 %. O grão tem uma forma, aproximadamente, ovóide, rodeado por camadas protectoras de casca, com um pequeno embrião na ponta. Este embrião é a parte que cresce para dar origem à nova planta (os primeiros rebentos verdes são denominados por plúmula), enquanto o endosperma persiste como fonte de alimento (Hughes e Baxter, 2001).

O processo de fabrico da cerveja envolve várias etapas, que se encontram representadas, de um modo geral, na Figura 2.1, e que são discutidas e comentadas no texto que se segue. Todavia, consoante o tipo de cerveja, o diagrama de produção é diferente, pois há certas fases que são alteradas ou mesmo eliminadas, para conferir propriedades distintas à cerveja. Neste diagrama não se apresenta a maltagem (processo de germinação dos grãos de cevada), pois não constitui uma fase do diagrama de produção da cerveja.

O principal objectivo do processo de maltagem é eliminar, na maior extensão possível, as β -glucanas das paredes celulares e algumas proteínas insolúveis que possam obstruir o acesso das enzimas ao interior dos grânulos de amido da farinha. Durante o processo desenvolvem-se, também, enzimas específicas que vão converter o amido em açúcares solúveis (Lewis e Young, 1996).

Na maltagem, a cevada é molhada de modo a que o seu teor de água aumente de 12% para cerca de 45% (Hughes e Baxter, 2001; União Cervejeira, 1993). O aumento do teor de água estimula a respiração do embrião e hidrata as fontes de amido do endosperma. Com este aumento de actividade do embrião, produzem-se hormonas naturais que se difundem para o interior da aleurona onde vão estimular a produção de enzimas hidrolíticas, durante a germinação. O grão húmido é, então, levado a germinar durante alguns dias. Durante este

tempo tem de se fazer um arejamento adequado para manter a temperatura a cerca de 16 °C e, assim, evitar as perdas de água (União Cervejeira, 1993). De entre as enzimas hidrolíticas produzidas neste processo fazem parte: 1) as amilases, que quebram as cadeias de amido; 2) as proteases, que atacam as proteínas e 3) as enzimas celulíticas, que hidrolisam as paredes celulares. Também se produzem β -glucanases que vão actuar sobre a parede celular do endosperma permitindo, assim, que as restantes enzimas se difundam até ao amido, onde começam por quebrar a estrutura celular e as reservas de proteínas, amido e lípidos, com o objectivo de providenciar nutrientes à nova planta. Este processo dura cerca de 4 ou 5 dias, após os quais, a maior parte das paredes celulares deverão encontrar-se hidrolisadas, para não causarem problemas numa fase posterior do processo. Parte das proteínas insolúveis de elevado peso molecular devem estar hidrolisadas em pequenos fragmentos (peptídeos e aminoácidos) e uma quantidade suficiente de enzimas amilolíticas devem ter sido sintetizadas. Nesta altura, a maior parte do amido permanece intacto, com excepção dos grânulos pequenos (cerca de 2 μ m de diâmetro), que são os primeiros a serem degradados durante o processo de maltagem. Se estes grânulos persistirem no *malte* (nome dado à cevada depois do processo de maltagem) podem causar problemas na filtração do mosto (Hughes e Baxter, 2001, Lewis e Young, 1996).

Quando a plúmula atinge cerca de $\frac{3}{4}$ da dimensão do grão, o que acontece à volta do 8º dia de germinação, o processo é interrompido (União Cervejeira, 1993). Os grãos são secos a cerca de 50 °C para inibir actividades enzimáticas e para produzir um material estável, que pode ser guardado. Este processo também remove componentes voláteis responsáveis pelo aroma indesejável a cereais e favorece o desenvolvimento de outros aromas mais desejáveis. Um aquecimento posterior, acima dos 85 °C faz o malte atingir a coloração pretendida e o aroma peculiar. Elevadas temperaturas (mais de 200 °C) podem ser aplicadas quando se pretende produzir maltes especiais com sabor e aroma a café, caramelo e/ou torrado. Os diferentes tipos de malte servem, depois, para produzir diferentes tipos de cervejas, com aroma e sabor distintos.

O processo de fabrico da cerveja propriamente dito inicia-se com a transformação do malte em farinha – Brassagem (Figura 2.1). Esta farinha é introduzida numa caldeira de empastagem, onde é misturada com água a cerca de 65 °C, durante 1 hora. A esta temperatura, o amido gelatiniza e pode ser atacado pelas enzimas presentes na mistura,

previamente formadas durante a germinação. Dá-se, assim, a sacarificação do amido, passo decisivo na obtenção do mosto, xarope líquido e doce. Este líquido contém, principalmente, maltose e glucose (açúcares fermentáveis) e quantidades significativas de pequenas cadeias de dextrinas (açúcares não fermentáveis). O mosto também contém proteínas solúveis, polipeptídeos e aminoácidos. A mistura final segue depois para o filtro ou cuba-filtro, onde são separados os resíduos de malte (Lewis e Young, 1996, União Cervejeira, 1993).

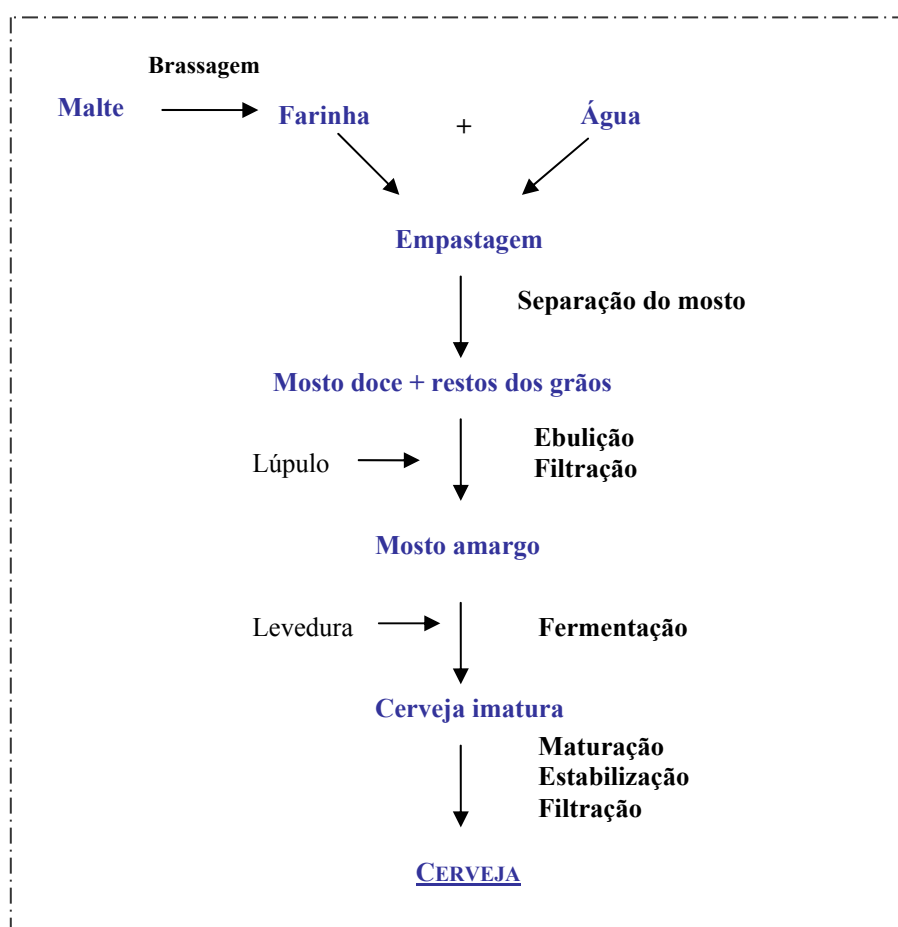


Figura 2.1 Esquema simplificado de um diagrama de produção de cerveja (adaptado de Hughes e Baxter, 2001).

De seguida, o mosto é introduzido numa caldeira de ebulição onde são adicionados o lúpulo e o extracto de lúpulo. A mistura é levada a ferver vigorosamente durante cerca de 2 horas. A operação de ebulição tem as seguintes finalidades principais: esterilização e concentração do mosto, reduzindo, por evaporação o volume de água; destruição das

enzimas, evitando que os desdobramentos prossigam durante a fermentação; coagulação de substâncias azotadas instáveis; extracção dos princípios aromáticos (óleos essenciais que contribuem para o aroma da cerveja), da humulona e de outros ácidos- α do lúpulo (Figura 2.2), que depois de isomerizados, conferem ao mosto o seu amargor característico e um certo poder anti-séptico (Hughes e Baxter, 2001; Nord *et al.*, 2003; União Cervejeira, 1993).

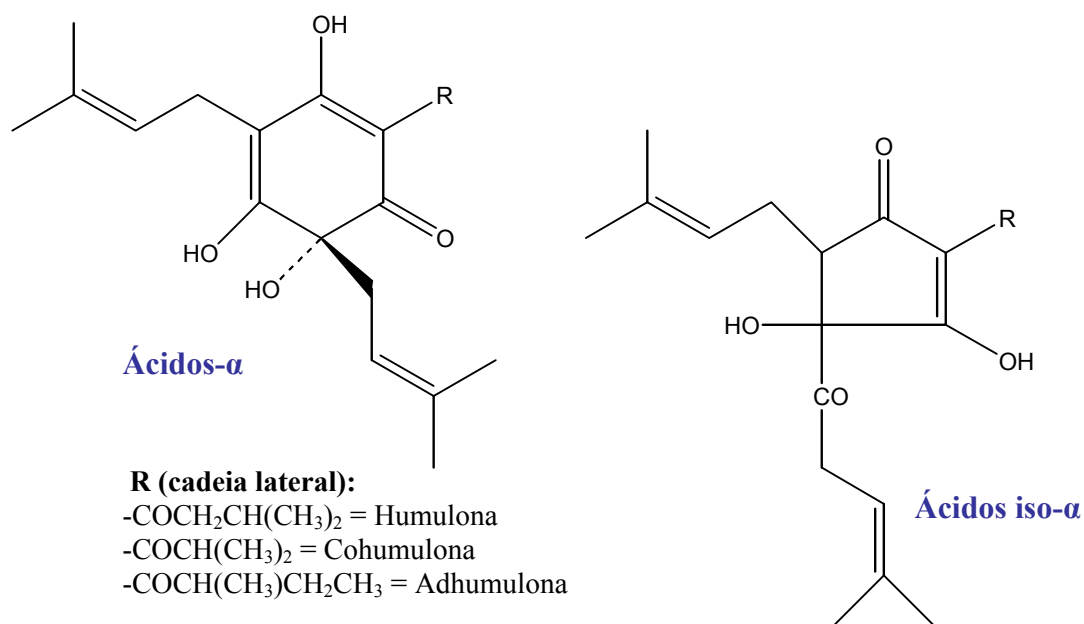


Figura 2.2 Estrutura dos ácidos do lúpulo (Hughes e Baxter, 2001).

A maior parte dos compostos contidos no lúpulo, e que são essenciais para o aroma da cerveja, são voláteis e podem-se perder na evaporação durante a ebulição. Assim, o processo de ebulição deve ser controlado de modo a que a sua extensão seja suficiente para coagular proteínas e isomerizar os ácidos do lúpulo, mas, permitindo ainda reter quantidades apreciáveis dos compostos aromáticos.

Durante a ebulição ocorrem, também, reacções de acastanhamento (“browning”) (Figura 2.3) entre os açúcares redutores e as aminas primárias do mosto, resultando num aumento da cor e perda de algum azoto aminado (Hughes e Baxter, 2001).

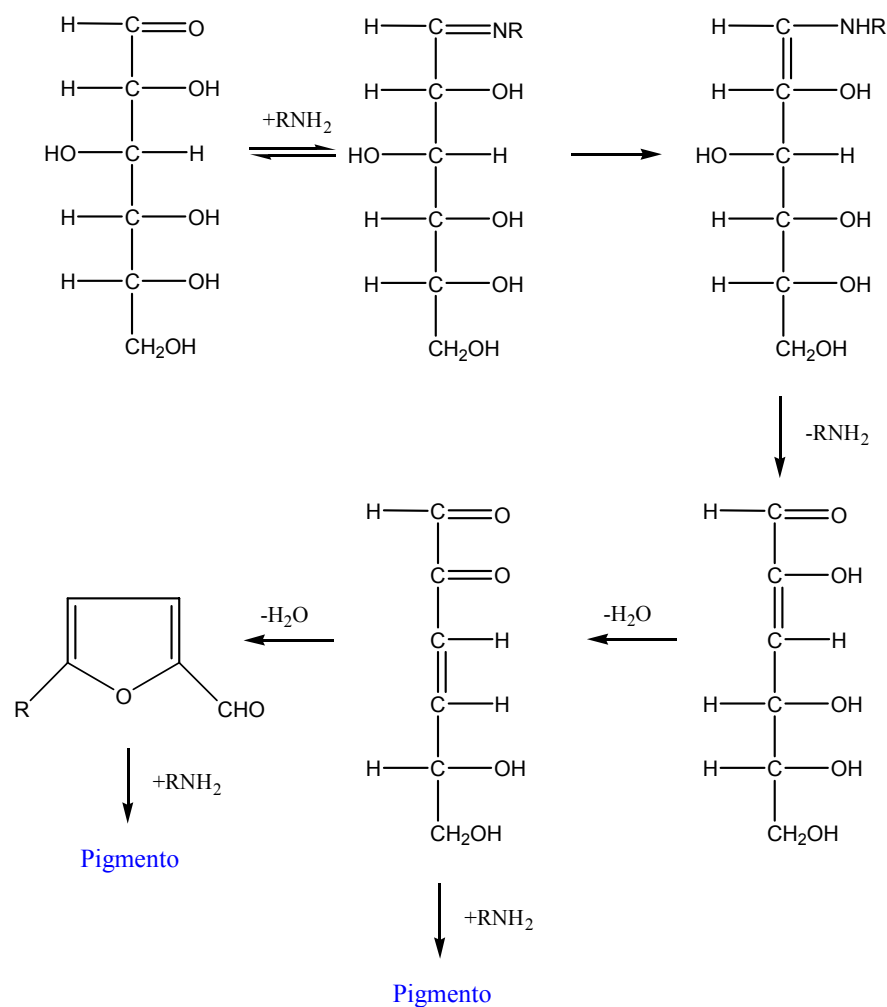


Figura 2.3 Reações de acastanhamento (“browning”) ocorridas durante a ebulição do mosto (Hughes e Baxter, 2001).

Finda a ebulição, o mosto é separado das substâncias coaguladas e dos resíduos de lúpulo, por simples decantação, por centrifugação ou, ainda, por filtração. Procede-se, de seguida, ao seu arrefecimento até uma temperatura na ordem dos 7 °C, arrefecimento este que provoca a precipitação dos componentes proteino-tânicos. Uma vez clarificado e refrigerado, o mosto lupulado está pronto para a operação seguinte (União Cervejeira, 1993).

A fermentação ocorre a 7-13 °C nas cervejas “lager” e a 16-18 °C nas cervejas “ale”. O mosto clarificado e refrigerado é bombeado para cubas de fermentação, sendo-lhe adicionada a levedura de cultura apropriada ao tipo de cerveja que se quer produzir. Por

exemplo, nas cervejas “lager” a levedura é do tipo fermentação baixa (“bottom fermenting”), enquanto que nas cervejas “ale” a levedura é do tipo fermentação alta (“top fermenting”) (Lewis e Young, 1996). Durante a fermentação a levedura consome os aminoácidos e açúcares do mosto. Estes são metabolizados para produzir dióxido de carbono e etanol, segundo a reacção seguinte:



Os aminoácidos são usados no crescimento celular e, por isso, no fim da fermentação a massa celular deve ter aumentado cerca de 20 vezes. A levedura também produz compostos voláteis, principalmente álcoois e ésteres, que contribuem para o aroma e sabor. Sendo assim, o tipo de levedura usado é determinante para as características organolépticas da cerveja.

A fermentação no início é tumultuosa, com abundante formação de espuma; torna-se depois, progressivamente mais lenta, até que a levedura se deposita no fundo do tanque. Realiza-se em cubas fechadas para que o anidrido carbónico em excesso possa ser recuperado e mais tarde utilizado (após depuração e liquefacção), quer na correcção da carbonatação da própria cerveja, quer para a sua extracção do barril. Esta operação corresponde à fermentação de um tipo de cerveja designado por “de fermentação baixa ou lager”. No caso de cervejas “de fermentação alta ou ale”, as células de levedura, em vez de se depositarem nas cubas, sobrenadam na cerveja. Hoje em dia, com o avançar da tecnologia, tanto as “lager” como as “ale” são fermentadas em cubas cilindro-cónicas fechadas, que permitem uma separação fácil da levedura para uma possível reutilização (Hughes e Baxter, 2001; União Cervejeira, 1993).

A maturação corresponde ao período de estacionamento da cerveja, a temperatura adequada, com o objectivo de permitir a libertação dos componentes voláteis indesejáveis às características finais da bebida. Durante este tempo, quantidades relativamente pequenas de levedura permanecem em contacto com a cerveja, para produzirem mais dióxido de carbono, que permite a carbonatação da cerveja e a purga dos compostos voláteis indesejáveis. As leveduras ajudam ainda na remoção de certos componentes activos do

sabor e aroma, catalisam, particularmente, a redução das dicetonas vicinais, como o diacetilo, em dióis que não afectam o sabor/aroma (Hughes e Baxter, 2001).

A estabilização é a operação seguinte do ciclo de fabrico e consiste em deixar estabilizar o líquido, a temperaturas entre os 0 °C e -2 °C, de modo a permitir que a cerveja se equilibre coloidalmente. Esta estabilização, que ocorre no mesmo tanque em que se realizou a fermentação ou noutro de características idênticas, vai proporcionar a clarificação do mosto, pois permite a deposição das células de levedura ainda existentes e dos coágulos que ainda se possam formar devido ao arrefecimento. Ao mesmo tempo, o dióxido de carbono libertado durante a fermentação vai-se dissolvendo no líquido (União Cervejeira, 1993).

A filtração ocorre logo que o técnico cervejeiro julgue a cerveja suficientemente madura e estabilizada. É esta operação que dá à cerveja a sua limpidez cristalina, eliminando-se os últimos elementos de turvação, ainda em suspensão. Consiste em bombear o líquido através de um meio filtrante adequado (União Cervejeira, 1993). A cerveja, agora, está pronta!

O enchimento é a última operação, aquela que permite aproximar a cerveja do consumidor final, quer em garrafa, lata ou barril. Com o objectivo de assegurar um determinado nível de carbonatação da cerveja, esta operação processa-se em condições isobarométricas, isto é, terá de haver pressões iguais na enchedora e na embalagem a encher. Nesta fase final, há que evitar a todo o custo a entrada de ar nas embalagens, pois isso provocaria posteriores oxidações e um envelhecimento precoce. É que a cerveja, ao contrário dos vinhos que possuem grau alcoólico bem mais elevado, só tem a perder com a idade (União Cervejeira, 1993).

2.2 Composição Química e Propriedades da Cerveja

2.2.1 Compostos Responsáveis pela Espuma, Cor e Turvação da Cerveja

A *Espuma*, a *Cor* e a *Turvação* da cerveja são três parâmetros, claramente, apreciados pelo consumidor e de importância vital para a sua selecção e satisfação. Deste modo, é necessário conhecê-los, saber o que os pode afectar e como se podem adaptar ao gosto do cliente.

A **Espuma** é um sistema coloidal constituído por uma fase gasosa descontínua e uma fase líquida ou sólida contínua. A quantidade de líquido que se mantém na espuma é, fortemente, dependente do tempo, o que complica o estudo deste sistema heterogéneo. A espuma da cerveja é estabilizada pela presença de polipeptídeos e ácidos, fornecidos pelo lúpulo, e que proporcionam o amargor característico. No entanto, existem muitos outros compostos, que contribuem para as características e propriedades da espuma.

Existe uma grande variedade de *proteínas* na espuma, sendo a proteína Z da cevada, aquela que se encontra em maiores quantidades. Também existe uma porção significativa de proteínas derivada das células da levedura. As proteínas glicosiladas não-enzimáticas, as glicoproteínas, as proteínas de elevado ponto isoelectrico ou as proteínas hidrofóbicas, são apontadas como grandes contribuintes para a estabilidade da espuma. Mais precisamente, é o seu carácter anfipático, isto é, a presença das duas regiões, polar e apolar, na mesma molécula, em vez da sua hidrofobicidade, que é uma propriedade crucial para a actividade da espuma (Hughes e Baxter, 2001).

Os *polissacarídeos* são polares e por isso, isoladamente, não são estabilizadores da espuma da cerveja. No entanto, quando associados a proteínas (glicoproteínas), formam regiões polares que se podem estender para o interior das bolhas e assim aumentar a estabilidade da espuma.

Os *ácidos iso- α* estão concentrados na espuma e são os maiores responsáveis pelo amargor das cervejas. Derivam do lúpulo e é a sua hidrofobicidade que influencia a separação da espuma.

Alguns *catiões metálicos* são indutores da formação de espuma. No passado, os sais de ferro eram usados para melhorar a espuma das cervejas, até que se descobriu que, também, eram responsáveis pela deterioração do sabor e do aroma. Em 1950 foi demonstrada uma excelente correlação entre a estabilidade da espuma da cerveja e o conteúdo de ácidos iso- α , aos quais se tinha adicionado cerca de 10 mg/L de Níquel (II) (Hughes e Baxter, 2001). Uma possível estrutura da associação dos ácidos iso- α com um catião metálico é apresentada na Figura 2.4.

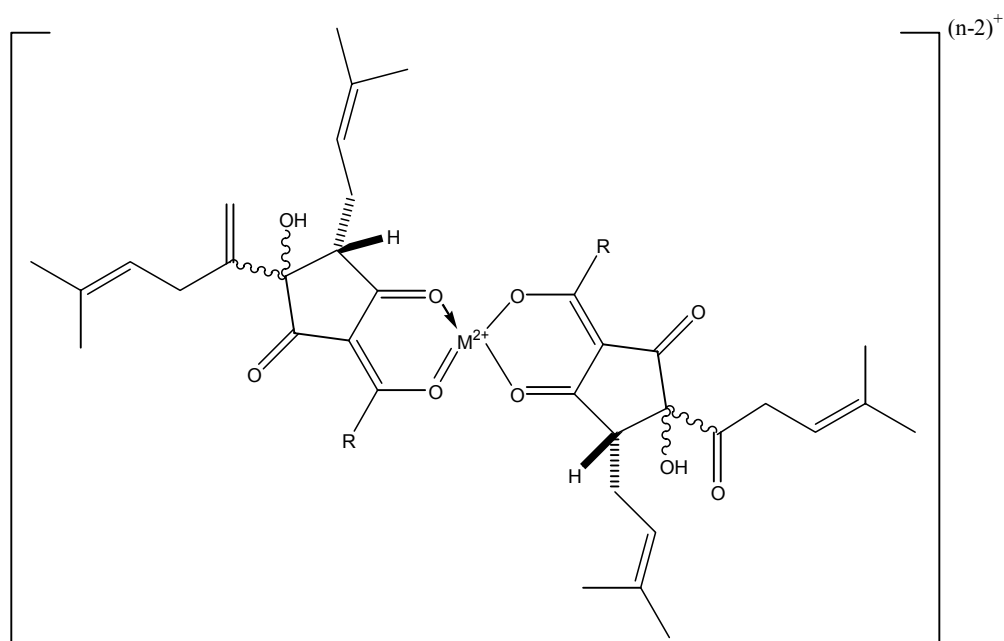


Figura 2.4 Estrutura dos ácidos iso- α ligados a catiões metálicos (Hughes e Baxter, 2001).

A presença do *etanol* aumenta a viscosidade da água e por isso reduz a taxa de drenagem do líquido da espuma. Os *lípidos* e *álcoois* de elevado peso molecular são exemplos de espécies anfipáticas, que conseguem adsorver na interface água-gás. A sua adição à cerveja é prejudicial à espuma.

O *dióxido de carbono* foi o único componente utilizado no gás da espuma da cerveja até aparecer a Guinness, que foi a primeira cerveja com *azoto*. Este é o principal responsável pela sua espuma densa e cremosa característica. O azoto é muito pouco solúvel na cerveja e, por isso, a sua adição resulta numa elevada pressão interna dentro da lata. Quando se abre a lata de cerveja, esta pressão liberta-se e o azoto é capturado pelo pequeno

dispositivo mecânico que está no interior da lata, levando à formação de espuma abundante.

O pH é um factor importante na estabilidade da espuma da cerveja. Verifica-se que quando o pH é baixo, a estabilidade da espuma é maior, pois um número significativo de ácidos, provenientes do lúpulo, é indissociável num intervalo pequeno de valores de pH. Isto significa que estes ácidos são mais hidrofóbicos e podem adsorver na interface com mais eficiência.

A **Cor** da cerveja é uma propriedade determinante que permite aos consumidores distinguir o tipo de cerveja, assim como os requisitos de controlo da produção. Em princípio, toda a cor da cerveja se forma durante a produção do malte e do mosto, sendo responsáveis 4 agentes principais: melanóides, polifenóis oxidados, metais vestigiais (ferro e cobre) e riboflavina (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Principais contribuintes químicos para a cor da cerveja (Hughes e Baxter, 2001).

Componente	Fonte		Cor
	Matéria-prima	Processo	
Melanóides	Malte e maltes especiais	Ebulição / aquecimento do mosto	Amarelo, âmbar
Polifenóis oxidados	Malte, lúpulo	Oxigenação, pasteurização	Vermelho, castanho
Ferro, cobre	Água, malte	-	-
Riboflavina	Malte, levedura	-	Amarelo

O primeiro contribuinte para a cor da cerveja é o grupo de compostos designados por *melanóides*, pigmentos solúveis, com um intervalo de cores desde o âmbar até ao amarelo, formados a partir das Reacções de Maillard. Por serem formados a partir das reacções térmicas entre açúcares e aminoácidos livres, o conteúdo em proteínas do malte e o regime de mistura influenciam a quantidade e o perfil dos melanóides que se formam. As reacções de Maillard podem ocorrer durante a germinação e torra do malte, durante o aquecimento da cevada para a produção de cervejas pretas, na brassagem, no aquecimento do mosto, na separação dos resíduos sólidos e no arrefecimento do mosto. A formação de melanóides é favorecida pelos processos a elevadas temperaturas. Estas temperaturas, usadas na produção dos maltes muito torrados e cevada torrada, favorecem as reacções de

caramelização. Os compostos resultantes têm uma cor vermelho-acastanhada intensa e são usados na produção de cervejas pretas e “ale” (Hughes e Baxter, 2001; Lewis e Young, 1996).

A segunda fonte significativa para a cor da cerveja são os *polifenóis oxidados*. Geralmente, a cor vermelho-acastanhado pode ser formada a partir dos polifenóis do malte. No entanto, outros factores, como a moagem do malte e excessiva agitação, podem influenciar a produção de polifenóis. O oxigénio também tem um papel importante na cor, pois o arejamento ou oxigenação do mosto, enquanto permanece quente, resulta num melhoramento da cor. A sua presença na embalagem favorece a formação da cor depois da pasteurização.

A terceira fonte de cor pode ser devida às interacções com *metais vestigiais*. Assim, o cobre e o ferro podem estimular a oxidação de compostos (por exemplo dos polifenóis).

Finalmente, a *riboflavina* (vitamina B2 presente nas células da levedura) pode contribuir, significativamente, para a cor das cervejas do tipo “pale lager” (cervejas leves e pálidas) (Hughes e Baxter, 2001).

A **Turvação** da cerveja é um parâmetro fortemente apreciado pelo consumidor, que depende das várias etapas do processo de fabrico. O efeito visual pode ir desde um ligeiro brilho até à observação de partículas discretas.

O fabrico da cerveja é, por natureza, um processo heterogéneo, onde frequentemente é necessário a separação de sólidos e líquidos. No início do processo de fabrico, o malte moído é misturado com água, normalmente, numa proporção de 1:3 (p/p), para afectar a actividade enzimática e a extracção dos componentes de interesse. Nem todo o malte é solubilizado e por isso há necessidade de separar este material insolúvel do mosto doce. Esta separação pode ser feita por filtração ou sedimentação da mistura. Nestes dois casos, os sólidos são lavados com água quente (normalmente a 70 °C) para recuperar algum extracto residual. Um uso excessivo de água durante o processo de separação, pode extrair quantidades significativas de polifenóis, que podem conferir uma potencial turvação ao mosto. Este mosto é depois fervido. O aquecimento vigoroso permite a remoção do excesso de proteínas e polifenóis (e outros compostos minoritários), que floculam. Se o aquecimento não é vigoroso, certos componentes responsáveis pela turvação permanecem na cerveja.

2.2.2 Compostos Responsáveis pelo Sabor e Aroma da Cerveja

Para qualquer alimento ou bebida as características sensoriais são um parâmetro vital para a apreciação do produto pelo consumidor. Existem quatro sabores básicos que são detectados pela língua: doce, salgado, ácido e amargo. Além disso, e com uma importância relevante para a cerveja, existe um nervo que responde a sabores irritantes, como o picante, a cebola e o dióxido de carbono. Este último é extremamente importante e desempenha um papel fundamental na percepção sensorial da cerveja. A evolução do teor de dióxido de carbono na cerveja pode afectar o perfil dos compostos voláteis que estão presentes no espaço vazio, entre a cerveja e a cápsula da garrafa. O uso de azoto, como substituinte parcial do dióxido de carbono, confere um sabor/aroma suave e pode reduzir o impacto sensorial dos componentes presentes (Lewis e Young, 1996).

A **Doçura** da cerveja é consequência directa da presença de quantidades residuais de hidratos de carbono no produto final. Estes açúcares podem ter tido origem no malte (e não foram fermentados) ou podem ter sido adicionados como “primers” para estimular fermentações secundárias e assim aumentar os níveis de dióxido de carbono na cerveja. A contribuição dos açúcares mais importantes para a doçura da cerveja é apresentada na Tabela 2.2. Como se pode ver, dos açúcares apresentados, aquele que está presente em maior concentração na cerveja é a maltotriose. No entanto, a sua contribuição para a doçura é baixa em relação, por exemplo, à frutose.

Tabela 2.2 Níveis de doçura relativa e concentrações típicas de alguns açúcares encontrados na cerveja (a doçura é relativa à da sacarose = 1,0) (Hughes e Baxter, 2001).

Açúcar	Doçura Relativa	Concentração na cerveja (g/L)
frutose	1,1	0 – 0,19
glucose	0,7	0,04 – 1,1
sacarose	1,0	0 – 3,3
maltose	0,5	0,7 – 3,0
maltotriose	< 0,5	0,4 – 3,4

A **Acidez** da cerveja deve-se, obviamente, à presença de ácidos orgânicos na bebida final. Tipicamente o pH das cervejas varia de 3,9 a 4,4, podendo este intervalo ser alargado. Os principais ácidos encontrados na cerveja estão apresentados na Tabela 2.3. Os níveis finais

desses ácidos dependem do vigor da fermentação, pois eles são produzidos pela levedura. Como se pode observar, o sabor/aroma dos ácidos láctico e pirúvico é dificilmente detectável, enquanto que o ácido 3-metilbutanóico é facilmente sentido.

Tabela 2.3 Principais ácidos orgânicos encontrados na cerveja (Hughes e Baxter, 2001).

Ácido	Limite de percepção sensorial (mg/L)	Concentração na cerveja (mg/L)	Descrição do sabor/aroma
acético	175	30-200	Ácido, vinagre
propanóico	150	1-5	Ácido, vinagre, leite
butanóico	2,2	0,5-1,5	Manteiga, queijo, suor
2-metilpropanóico	30	0,1-2	Suor, amargo, azedo
pentanóico	8	0,03-0,1	Suor, odor corporal
2-metilbutanóico	2,0	0,1-0,5	Queijo, lúpulo, suor
3-metilbutanóico	1,5	0,1-2	-
octanóico	15	2-12	Cabra
láctico	400	20-80	Ácido
pirúvico	300	15-150	Ácido, salgado, ração
succínico	-	16-140	-

O sabor a **Salgado** da cerveja está directamente relacionado com a presença de aniões e catiões inorgânicos, por exemplo, potássio, sódio, cloro e fosfato (Tabela 2.4). A presença destes iões depende, principalmente da qualidade da água usada, podendo vir do malte.

Tabela 2.4 Principais compostos inorgânicos encontrados na cerveja (Hughes e Baxter, 2001).

Ião	Concentração na cerveja (mg/L)	Principais fontes	Efeito
potássio	200-450	Malte, adjuvantes	Salgado
sódio	20-350	Instrumentação, água	Enjoativo
cálcio	25-120	Instrumentação, água	Efeito favorável no sabor/aroma
magnésio	50-90	Instrumentação, água	Desagradável quando agregado ao sulfato
cloro	120-500	Água, amido hidrolisado	Cheio, doce, suave, tenro
sulfato	100-430	Água	Seco
oxalato	5-30	Malte	Turvação
fosfato	170-600	Malte, adjuvantes	-
nitrato	0,5-2,0	Água, lúpulo	Aumento da coloração

O sabor a amargo ou **Amargor** é fortemente atribuído a um grupo de compostos chamados ácidos iso- α . Estes não ocorrem naturalmente na cerveja mas são resultado da isomerização de produtos que ocorrem naturalmente – os ácidos- α (Figura 2.5). A isomerização é levada

a cabo durante a ebulição do mosto, com uma eficiência de 30% e, por isso, usam-se os ácidos- α do lúpulo para aumentar a quantidade dos ácidos iso- α .

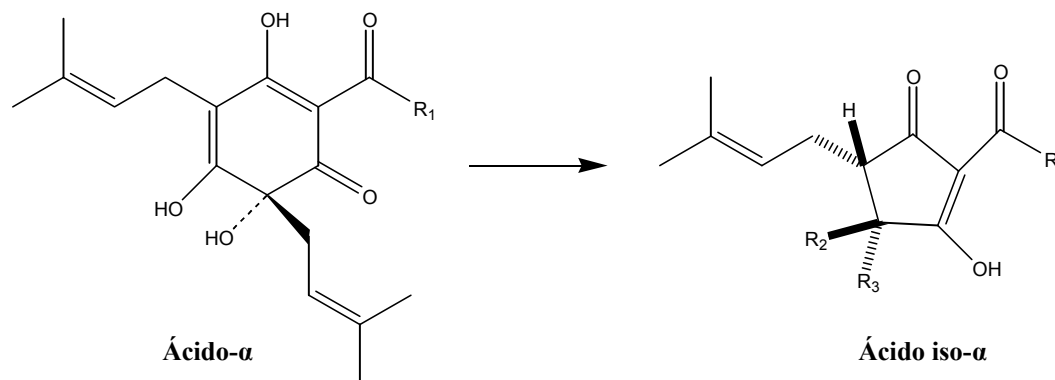


Figura 2.5 Isomerização dos ácidos- α em ácidos iso- α (Hughes e Baxter, 2001).

Devido à complexidade da cerveja, o aroma não é caracterizado por um ou alguns compostos bem definidos. Na verdade, muitos compostos contribuem para o aroma, individualmente, ou de modo sinérgico ou antagonista. Os *ésteres* e os *álcoois* são dois dos principais grupos de compostos que mais contribuem para o sabor e aroma da cerveja. Os principais ésteres encontrados na cerveja estão apresentados na Tabela 2.5. Como se pode ver, o acetato de etilo é o que está presente em maior concentração, mas é o menos detectável, sendo a concentração mínima necessária para se detectar o sabor/aroma de 30 mg/L. Dos compostos apresentados, aqueles que mais preocupam os cervejeiros, por provocarem sabores e aromas desagradáveis, são o acetato de etilo e o acetato de isoamilo, que são uma mistura de acetatos de 2- e 3-metilbutilo. O nível destes compostos é influenciado por vários factores incluindo a densidade do mosto e a quantidade de oxigénio a que as leveduras são expostas. Este último factor afecta o sabor e aroma da cerveja, pois os ésteres são formados a partir dos álcoois produzidos, quando o grupo acetato está disponível mas não é necessário para a biossíntese dos componentes das membranas das leveduras. Assim, factores que promovem o crescimento celular, como elevados níveis de oxigénio e baixo conteúdo de lípidos no mosto, desfavorecem a produção de ésteres (Lewis e Young, 1996).

Tabela 2.5 Principais ésteres encontrados na cerveja (Hughes e Baxter, 2001).

Éster	Concentração na cerveja (mg/L)	Limite de percepção sensorial (mg/L)	Descrição do sabor/aroma
acetato de etilo	10-60	30	Solvente, suor
acetato de isoamilo	0,5-5,0	1	Banana, éster, solvente
hexanoato de etilo	0,1-0,5	0,2	Maçã, frutado, suor
octanoato de etilo	0,1-1,5	0,5	Maçã, frutos tropicais, suor
acetato de 2-feniletil	0,05-2,0	3,0	Rosas, mel, maçã, suor
nicotinato de etilo	1,0-1,5	2	Perfume, granuloso

Na Tabela 2.6 apresentam-se os principais álcoois encontrados na cerveja. O álcool mais importante e, que na maioria das cervejas, está presente duas vezes mais do que qualquer outro álcool, é o etanol. Este contribui directamente para o sabor/aroma da cerveja, proporcionando um carácter “quente” à bebida, desempenha um papel importante na percepção de outros componentes e pode influenciar na sua distribuição pelo líquido, pela espuma ou pelo espaço vazio acima da cerveja (Lea e Piggott, 1995). O glicerol é o segundo álcool mais abundante. No entanto, a concentração necessária para se detectar o seu sabor e aroma é cerca de 70 vezes inferior à do etanol.

Tabela 2.6 Principais álcoois encontrados na cerveja (Hughes e Baxter, 2001).

Álcool	Concentração na cerveja (mg/L)	Limite de percepção sensorial (mg/L)	Descrição do sabor/aroma
metanol	0,5-3,0	10000	Alcoólico, solvente
etanol	20000-80000	14000	Alcoólico, forte
1-propanol	3-16	700	Alcoólico
2-propanol	3-6	1500	Alcoólico
2-metilbutanol	8-30	65	Alcoólico, vinoso, banana
3-metilbutanol	30-70	70	Alcoólico, vinoso, banana
2-feniletanol	8-35	125	Rosas, amargo, perfumado
1-octeno-3-ol	0,03	0,2	Relva cortada de fresco, perfume
2-decanol	0,005	0,015	Anis, coco
glicerol	1200-2000	-	Doce, viscoso
tirosol	3-40	200	Amargo, químico

A produção de cervejas de baixo teor em álcool ou mesmo sem álcool, baseia-se em métodos de remoção do álcool, prevenção da formação de quantidades significativas de etanol ou modificações no processo de modo a ajustar a falta de etanol. Os álcoois de peso molecular elevado são precursores dos ésteres e por isso a sua produção tem de ser controlada. São produzidos pela levedura, como metabolitos secundários do metabolismo

dos aminoácidos, mas também podem ser produzidos por outras vias, aumentando excessivamente no mosto. As condições que favorecem o crescimento celular, como uma excessiva oxigenação ou arejamento, promovem a formação de álcoois de elevado peso molecular (Hughes e Baxter, 2001; Pollock, 1981).

Ao contrário dos ésteres e dos álcoois, que são benéficos para o sabor/aroma da cerveja, as *dicetonas vicinais* (“Vicinal DiKetones” - VDK) são consideradas problemas e defeitos na bebida. A principal VDK na cerveja é a 2,3-butanodiona (diacetilo) mas também existem quantidades significativas de 2,3-pentanodiona, produzida durante a fermentação. Estas duas substâncias derivam do α -acetolactato e α -acetohidroxibutirato, respectivamente, e devem ser transformadas noutros compostos que afectem menos o sabor/aroma da cerveja (2,3-butanodiol e 2,3-pentanodiol) (Figura 2.6).

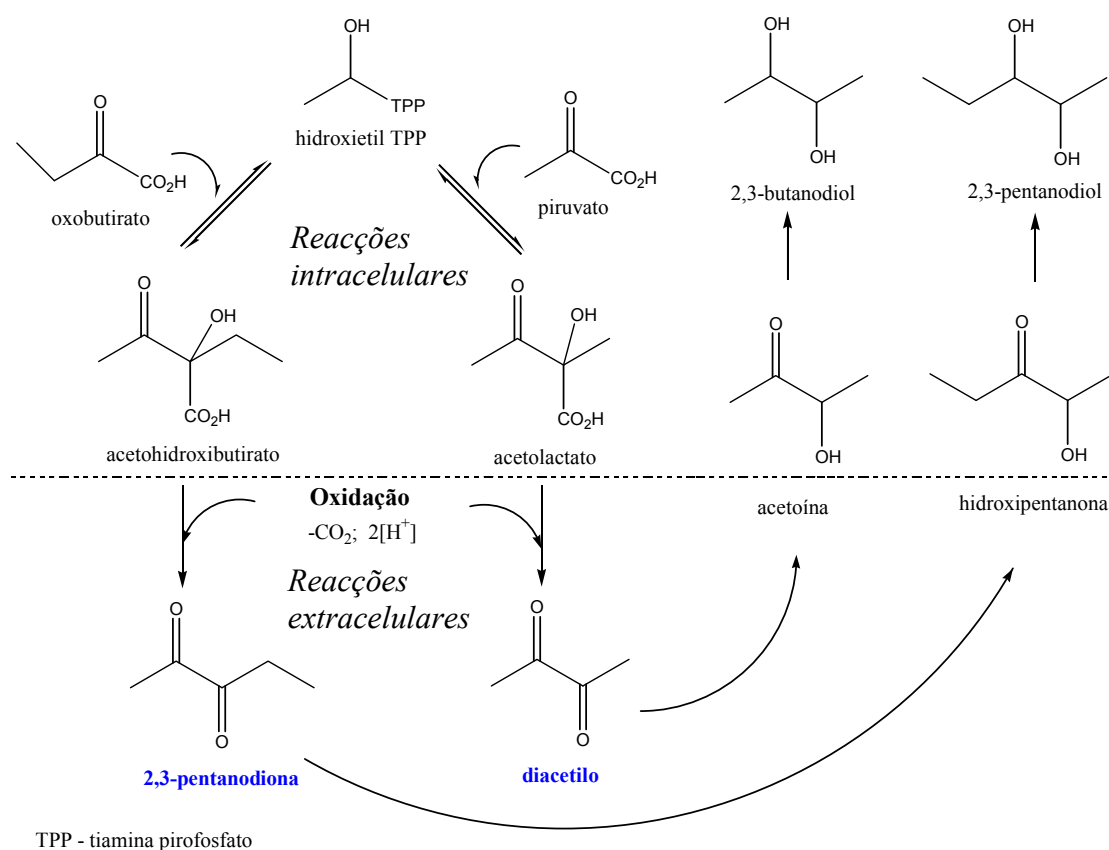


Figura 2.6 Vias de formação e subsequente destruição das dicetonas vicinais na cerveja (Hughes e Baxter, 2001).

A elevada temperatura no fim da fermentação facilita a rápida remoção das dicetonas vicinais. Também é possível decompor os precursores aquecendo a cerveja, sem oxigénio (para não afectar as características) e usando a levedura imobilizada para consumir as dicetonas vicinais livres. A adição da enzima acetolactato descarboxilase, que converte directamente o acetolactato, também pode ser uma boa opção. Na Tabela 2.7 apresentam-se as dicetonas vicinais referidas, assim como os produtos resultantes da sua degradação.

Tabela 2.7 Dicetonas vicinais e seus compostos reduzidos (Hughes e Baxter, 2001).

Dicetona Vicinal	Concentração na cerveja (mg/L)	Limite de percepção sensorial (mg/L)	Descrição do sabor/aroma
2,3-butanodiona	0,01-0,4	0,07-0,15	Manteiga e caramelo
3-hidroxi-2-butanona	1-10	17	Frutado, mofo, madeira
2,3-butanodiol	50-150	4500	Borracha, suor, quente
2,3-pentanodiona	0,01-0,15	0,9	Manteiga, frutado
3-hidroxi-2-pentanona	0,05-0,07	-	-

A maior parte das características aromáticas da cerveja são devidas aos *compostos sulfurados*. Nas cervejas do tipo “ale” é normal aparecerem quantidades apreciáveis de sulfeto de hidrogénio e isso contribui para as características da bebida. No entanto, devem evitar-se níveis muito elevados para não aparecerem odores desagradáveis. A levedura que opera nas cervejas “ale” tem maior capacidade de reduzir o dióxido de enxofre a sulfeto de hidrogénio. Este tem um ponto de ebulição a -60 °C e por isso, o controlo do processo, nomeadamente da evolução do dióxido de carbono, pode ajudar a baixar o composto para níveis razoáveis, sendo necessário uma fermentação vigorosa (Hughes e Baxter, 2001). O carácter sulfurado das cervejas “lager” é mais complexo. O composto presente em maior quantidade é o sulfeto de dimetilo - DMS (“Dimethyl sulfide”), que é originado na degradação do malte e que quando não é eliminado fornece à cerveja um aroma indesejável, semelhante ao de couves cozidas. Durante a ebulição do mosto o DMS pode-se perder por evaporação.

A adição do lúpulo à cerveja não só contribui para o amargor característico mas também para o aroma a lúpulo. São os constituintes do óleo, extraído do lúpulo, que contribuem mais para o aroma da cerveja. Este óleo é constituído por cerca de 40-80% de hidrocarbonetos, principalmente, por terpenos. O mirceno é o mais abundante (cerca de 30%) (Hughes e Baxter, 2001). Por outro lado, a secagem do malte ajuda a reduzir os

níveis de compostos responsáveis pelo sabor/aroma desagradáveis (por exemplo aldeídos – hexanal). O grau de coloração obtido durante a secagem está relacionado com as reacções de Maillard e consequentes produtos responsáveis pelo sabor/aroma. As reacções químicas promovidas pelo calor incluem a degradação térmica dos ácidos fenólicos, caramelização dos açúcares, reacções de Maillard (incluindo a degradação de Strecker dos aminoácidos) e degradação térmica dos ácidos gordos oxigenados. Assim, um grande número de compostos voláteis é produzido, como por exemplo, ácidos gordos, aldeídos, álcoois, furanos, cetonas, fenóis, pirazinas e compostos sulfurados. No entanto, muitos são perdidos durante a ebulição do mosto, por evaporação, degradação química ou durante a fermentação, por acção da levedura (Hughes e Baxter, 2001).

2.3 Fundamentos dos Métodos Usados

2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR) baseia-se no estudo da interacção da luz de infravermelho com a matéria (Smith, 1996). A radiação no infravermelho é dividida em três gamas, conforme a sua energia: longínquo, médio e próximo, sendo a mais popular e usada em química alimentar a do infravermelho próximo (NIR) (Lachenal, 2000). A tabela seguinte define as regiões referidas (Kellner *et al.*, 1998).

Tabela 2.8 Regiões do infravermelho.

Região	Gama de Comprimentos de onda (μm)	Número de onda (cm^{-1})
Próximo	0,78 – 2,5	12800 - 4000
Médio	2,5 – 50	4000 - 200
Longínquo	50 – 1000	200 - 10

No processo de absorção de energia, as frequências da radiação que se igualam com as frequências vibracionais naturais da molécula em questão, que têm origem nos modos de extensão (simétrica e assimétrica) e de flexão, são absorvidas, aumentando a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula. No entanto, nem todas as ligações numa molécula são capazes de absorver a energia de infravermelho, mesmo se a frequência da radiação for igual à frequência do movimento; apenas as ligações que têm momento dipolar, que se altera durante a vibração, são capazes de absorver a radiação (Pavia *et al.*, 1996). A vibração deve ser assimétrica e implicar uma variação do dipolo eléctrico da molécula. Quanto maior a simetria da molécula, menor o número de bandas observadas, pois algumas ligações absorvem à mesma frequência. A intensidade das bandas, além de depender da concentração do composto na amostra, depende da natureza e da polaridade das ligações. Por exemplo, a ligação C=O, fortemente polar e composta por átomos diferentes, absorve fortemente, enquanto que a ligação C=C tem, relativamente, fraca absorção.

Os diferentes grupos funcionais de uma molécula absorvem a frequências diferentes (Tabela 2.9). Moléculas com um mesmo grupo funcional apresentam nos seus espectros bandas sensivelmente à mesma frequência, independentemente da sua cadeia atômica principal, sendo esta absorção denominada frequência de grupo. Estas frequências encontram-se a números de onda superiores a 1300 cm^{-1} .

A região $1300\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ contém bandas vibracionais que são mais dificilmente atribuíveis a grupos funcionais específicos, uma vez que as massas e as forças de ligação de cada uma das espécies absorventes são muito similares. Também podemos encontrar combinações de frequências de vibrações. No entanto, esta região contém bandas com especial significado para a molécula como um todo, sendo denominada por região de impressão digital (Kellner *et al.*, 1998).

Tabela 2.9 Valores de absorção no infravermelho para diferentes grupos funcionais (Stuart *et al.*, 1996).

Número de Onda (cm^{-1})	Grupo Funcional
3640-3610	O-H (livre)
3500-3070	N-H
2960-2850	C-H alifáticos
1750-1740	C=O de ésteres
1740-1720	C=O de aldeídos
1720-1700	C=O de cetonas
1675-1645	C=C
1590-1550	NH ₂
1470-1430	CH ₂
1390-1370	CH ₃
1420 e 1300-1200	C-O de ácidos carboxílicos
1300-1020	C-O de ésteres
1200-1050	C-O de álcoois e fenóis
1155-1150	C-O de hidratos de carbono
1024-998	C-OH de hidratos de carbono
≈ 920	O-H

Apesar da espectroscopia de infravermelho ser útil na elucidação estrutural de compostos, também pode ser usada em análises quantitativas, uma vez que as bandas de absorção no

infravermelho são proporcionais à concentração das espécies absorventes. No entanto, a interpretação de um espectro de infravermelho de um sistema complexo, como é o caso da cerveja, não é fácil, pois há bandas que podem sobrepor-se a outras. Também diferentes absorções secundárias (harmónicos) podem aparecer, exactamente, na mesma frequência de uma banda fundamental. A banda de absorção de certos grupos pode ser desviada por várias características estruturais (conjugação, atracção de electrões por um grupo substituinte vizinho, tensão angular, tensão de Van Der Waals, ligações de hidrogénio) e ser tomada erradamente por uma banda de um grupo inteiramente diferente (Morrisson e Boyd, 1992). Assim, por si só, o FT-IR, apresenta algumas dificuldades quando se quer caracterizar uma amostra heterogénea. No entanto, torna-se bastante útil quando combinado com métodos estatísticos ou outras técnicas de espectroscopia molecular, como a espectroscopia de RMN, a espectrometria de massa, a espectroscopia de UV/VIS e dispersão de Raman, pois todas estas técnicas proporcionam informações diferentes acerca da estrutura das moléculas e em conjunto fornecem uma explicação poderosa e eficaz na identificação de moléculas.

O princípio básico dos espectrómetros de FT-IR é a detecção de múltiplos comprimentos de onda em simultâneo (“multiplex”), com vantagens energéticas na intensidade do feixe, redução do ruído de fundo, precisão na determinação dos comprimentos de onda e redução do tempo de análise (Perkins, 1986). A fonte de radiação usada neste tipo de espectrómetros – Global (SiC) – emite uma gama de comprimentos de onda que abrange toda a gama do infravermelho médio. O principal componente deste instrumento é o Interferómetro de Michelson, representado, esquematicamente, na Figura 2.7. A radiação enviada pela fonte passa por um orifício e interage com espelhos antes de chegar a um divisor de feixe. Aí, uma parte da radiação segue na mesma direcção, interagindo com um espelho em movimento, enquanto que a outra parte da radiação é reflectida para um espelho fixo. Ambos os espelhos reflectem a radiação que chega novamente ao divisor de feixe, sendo novamente dividida. Então, uma parte, interfere com a amostra, reduzindo a amplitude de algumas frequências, e chega ao detector. O espelho móvel pode mover-se de uma forma muito precisa e a uma velocidade determinada, de uma extremidade à outra do seu eixo. O movimento permite adquirir uma curva de intensidade da energia que chega ao detector em função do espaço percorrido pelo espelho – o interferograma. Adquirindo

diversos interferogramas e adicionando-os, pode-se diminuir o ruído. Tendo o interferograma médio, aplica-se a transformada de Fourier, obtendo-se um espectro de transmitância em função da frequência. Este pode ainda ser facilmente convertido num espectro de absorvância em função da frequência (ou do número de onda).

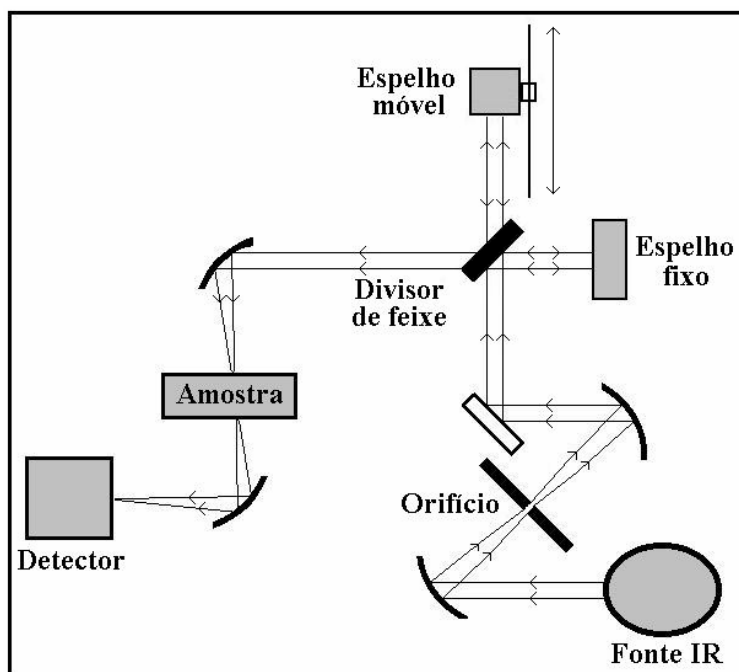


Figura 2.7 Esquema de um interferômetro de Michelson.

Existem diversos métodos de amostragem para adquirir os espectros de infravermelho, que se escolhem consoante o estado físico da amostra e a aplicação que se pretende. A técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR – do inglês “Attenuated Total Reflection”) pode ser usada no formato de reflexão múltipla (Figura 2.8) ou de reflexão única (Golden-Gate) como foi o acessório usado neste trabalho. Esta consiste na aplicação da amostra numa superfície com um índice de reflexão elevado (neste caso, um cristal de diamante), conhecido como elemento de reflexão interna. Quando a radiação de infravermelho penetra no cristal, com um ângulo abaixo do ângulo de incidência crítico, a reflexão total interna desta radiação incidente produz uma onda que se dissipa no limite entre o cristal e a amostra. Este raio reflectido penetra através do cristal, podendo ser absorvido por materiais em contacto com a sua superfície. A profundidade de penetração varia consoante o material do elemento de reflexão interno e o comprimento de onda a que absorve. Como a

interacção com a amostra é mais fraca e não há necessidade do feixe a atravessar, os problemas com a análise de soluções aquosas (que podem ter valores fracos de transmitância, devido a baixa concentração) diminuem. Além disso, os espectros apresentam valores absolutos semelhantes de absorvância/transmitância, em contraste com a aquisição em transmissão, que depende da espessura da amostra. Esta técnica permite a análise de sólidos e de líquidos pouco ou muito viscosos.

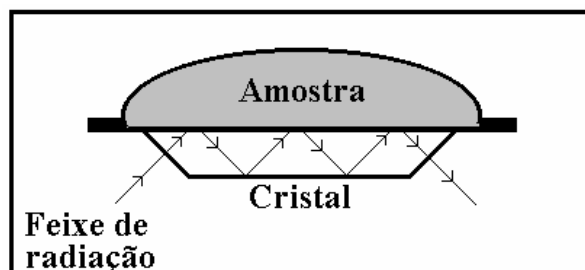


Figura 2.8 Esquema de um dispositivo de ATR (adaptado de Perkins, 1987).

Existem múltiplos modelos de cristais de ATR, com especificidades diferentes, desde os volumes de amostra maiores ou menores a uma profundidade regulável de penetração do feixe na amostra, para se obterem maiores valores de absorvância com substâncias que absorvem pouco. O tamanho do cristal influencia de forma decisiva o número de interações que o feixe tem com a amostra.

2.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Alta Resolução

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Alta Resolução é uma técnica potencialmente importante para a análise rápida e não destrutiva de sistemas complexos, isto é, que contêm um grande número de compostos diferentes, presentes em diversas gamas de concentração.

Os núcleos de certos átomos consideram-se animados de spin, ou seja possuem a capacidade de girar em torno do seu eixo. A rotação destas partículas carregadas positivamente gera um momento magnético (μ), orientado segundo o eixo de spin, o que significa que estes núcleos podem comportar-se como minúsculas barras magnéticas

(Figura 2.9a). Um desses núcleos é o do átomo do hidrogênio, ^1H , ou seja, o próton, que é caracterizado por um valor de número quântico de spin I igual a $1/2$. Se se colocar um próton num campo magnético externo, o respectivo momento magnético pode orientar-se de uma das duas maneiras seguintes: a favor ou contra o campo externo (Figura 2.9b). As duas orientações possíveis dos núcleos de ^1H correspondem a dois estados energéticos distintos, α e β ou $\pm 1/2$. A Espectroscopia de RMN de ^1H baseia-se na ocorrência de transições entre estes estados, por absorção de radiação na gama de frequências das ondas de rádio (60 a 750 MHz). O valor da energia absorvida é fortemente dependente do ambiente químico em que o próton se encontra e esta dependência é traduzida por uma quantidade denominada desvio químico (Skoog *et al.*, 1998; Claridge, 1999).

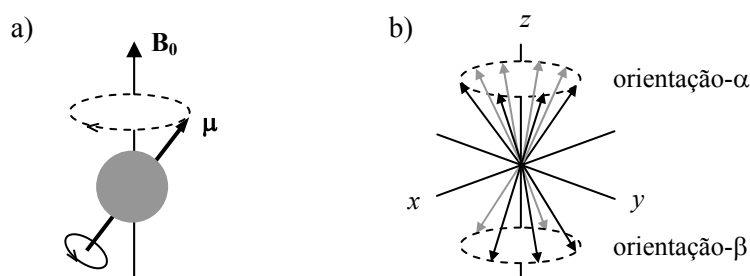


Figura 2.9 a) Rotação do núcleo magnético causada pela aplicação de um campo magnético estático B_0 ; b) as duas orientações possíveis do núcleo de ^1H (n° quântico de spin $I=1/2$) no campo magnético.

A amostra contendo os núcleos magnéticos é excitada por absorção selectiva da radiação, regressando depois ao estado inicial, com emissão de energia radiante no domínio das radiofrequências. A determinação precisa dos valores destas frequências específicas emitidas (ou dos correspondentes desvios químicos, em ppm) e da velocidade com que a amostra regressa ao estado de partida (relaxação), constituem a essência da informação pormenorizada que é possível obter, quer sobre a estrutura molecular da amostra, quer sobre a dinâmica interna global das suas moléculas. Assim, a análise qualitativa de uma amostra, através do registo do seu espectro de RMN (gráfico da absorvância em função do desvio químico), baseia-se na diferente localização dos picos ao longo do espectro, uma vez que a posição de cada um deles depende do ambiente químico que rodeia o próton, ou seja, do tipo de molécula em que se encontra. Para além disso, a intensidade ou área do pico de absorção é proporcional ao número de núcleos que originam esse pico, o que possibilita a quantificação dos componentes da amostra em estudo (Skoog *et al.*, 1998).

Os espectros de RMN podem ser adquiridos com base numa técnica de pulsos, com aplicação da Transformada de Fourier (TF), que permite obter um espectro em apenas alguns segundos. O método consiste em irradiar a amostra com um pulso de radiação, que tem a duração de alguns microsegundos e contém todas as frequências de interesse, provocando a excitação simultânea de todos os núcleos magnéticos da amostra. A seguir ao pulso, os núcleos começam a perder a energia absorvida, num processo designado por relaxação e que se regista num gráfico denominado FID (“Free Induction Decay”), que consiste num gráfico de intensidade da radiação emitida em função do tempo. O FID é, então, digitalmente monitorizado e guardado num computador. Passados alguns segundos, aplica-se um novo pulso e o FID correspondente é novamente monitorizado e adicionado ao primeiro. Este processo é repetido tantas vezes quanto desejado para obter a intensidade de sinal necessária, e no final, o FID resultante é convertido no espectro através do processo matemático de Transformada de Fourier (Figura 2.10) (Skoog *et al.*, 1998, Harris, 1987).

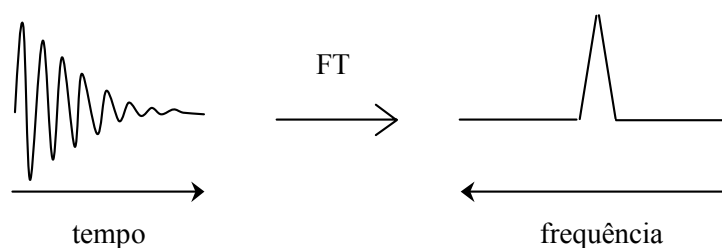


Figura 2.10 Transformada de Fourier do FID no correspondente espectro.

Geralmente, a primeira ferramenta usada para interpretar os sinais de RMN, consiste na comparação dos desvios químicos, da multiplicidade e das constantes de acoplamento (J), medidas num espectro 1D, com dados compilados na literatura e com espectros de referência de compostos que são esperados estarem presentes na amostra (Pretsch *et al.* 1989; Nicholson e Foxall, 1995; Fan, 1996). No entanto, os espectros de ^1H de alimentos e amostras biológicas são sempre muito complexos e a atribuição dos sinais é dificultada pelo alto grau de sobreposição dos sinais. Em alguns casos, não é possível observar todos os sinais de uma molécula e a determinação da multiplicidade e constantes de acoplamento não é óbvia. Por outro lado, os valores encontrados na literatura dependem de vários factores, tais como o pH, solvente e a referência para o desvio químico usada, e essas condições, muitas vezes não são relatadas. Assim, o RMN Bidimensional (2D) fornece

uma abordagem complementar e necessária para a atribuição dos sinais, uma vez que a informação é distribuída por duas dimensões e a sobreposição espectral é significativamente reduzida.

Todas as sequências de pulsos 2D têm o mesmo esquema básico que pode ser subdividido em 4 períodos bem definidos, denominados, **preparação**, **evolução**, **mistura** e **deteção** (Figura 2.11). Tipicamente, o período de preparação e de mistura compreendem um pulso ou um aglomerado de pulsos e/ou períodos de tempo fixos. Os pormenores dependem da natureza da experiência. O período de detecção é inteiramente análogo ao período de detecção de qualquer experiência 1D, em que o espectrómetro adquire o FID dos spins excitados. É o período de evolução que promove a chave da geração da segunda dimensão. O estado do sistema de spin depois de um certo tempo t_1 é, geralmente, alterado, pelo menos, 1 pulso de rádio-frequência. O sinal de ressonância é depois registado durante o tempo de detecção subsequente, t_2 . A experiência inteira é repetida com um incremento do tempo de evolução t_1 , pelo qual o estado inicial do sistema de spin nuclear, durante o período de detecção a $t_2=0$, muda conseqüentemente. Depois da compilação dos dados, os FID são transformados na dimensão t_2 , de modo a obter um conjunto de espectros cujas intensidades dos picos ou fases são moduladas como função do intervalo t_1 . A transformada de Fourier na dimensão t_1 converte a modulação da frequência em picos do espectro 2D, geralmente representados como um mapa de contornos.

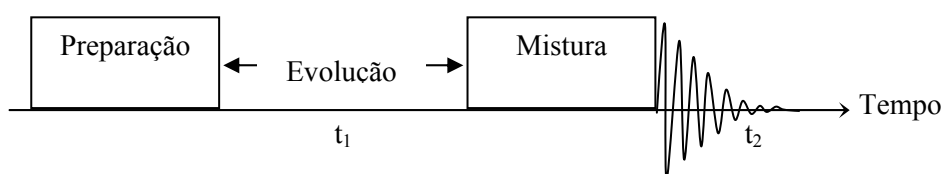


Figura 2.11 Esquema geral de uma experiência 2D.

Existem, essencialmente, duas classes de experiências de RMN 2D: 1) Experiências de correlação, nas quais a frequência de ressonância de um pico é relacionada com a dos seus vizinhos e, por isso, a conectividade molecular ou distâncias entre átomos podem ser determinadas; 2) Experiências de resolução, nas quais o eixo das frequências mostra duas diferentes interações. Por exemplo, no espectro 2D *J*-resolved, um eixo contém a informação sobre a constante de acoplamento enquanto o outro tem os dados do desvio

químico. Ambos os tipos de experiências foram usados neste trabalho com o objectivo de auxiliar a atribuição/identificação espectral da cerveja analisada.

A experiência de TOCSY (“TOtal Correlation SpectroscopY”) permite a correlação homonuclear de spins acoplados escalarmente, mas também é capaz de estabelecer correlações entre prótons que apesar de não estarem acoplados entre si, se encontram no mesmo sistema de spin e formam uma cadeia contínua de prótons acoplados spin-spin (Braunschweiler *et al.*, 1983). Na Figura 2.12 observa-se uma representação esquemática de um espectro de TOCSY do etanol, onde se pode ver o acoplamento de prótons.

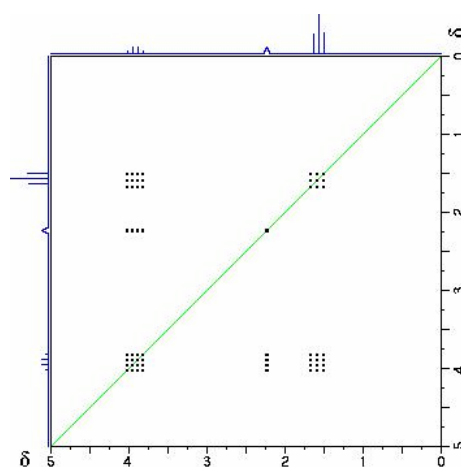


Figura 2.12 Representação esquemática do espectro de TOCSY do etanol.

A sequência de pulsos permite que a magnetização se propague ao longo da cadeia, por transferência de coerência de um ponto para o outro. Utiliza uma sequência de pulsos (“spin-lock”) no período de mistura, em vez de um pulso único, que tem por objectivo executar a transferência da magnetização numa cadeia de spins (Figura 2.13).

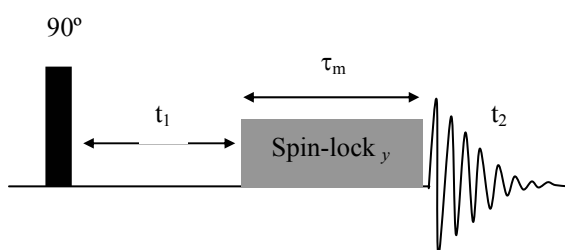


Figura 2.13 Sequência de pulsos da experiência TOCSY usando um pulso contínuo de baixa intensidade.

Os métodos originais para determinar correlações heteronucleares baseavam-se na observação do núcleo X de menor γ (razão magnetogirica), sendo o próton detectado indirectamente (e aparecendo ao longo da dimensão f1). Na última década esta forma de detecção alterou-se de modo a observar o núcleo com maior γ (^1H) e detectar o heteronúcleo indirectamente. A este processo dá-se o nome de correlação inversa e a principal vantagem é o aumento da sensibilidade permitindo, também, reduzir o tempo experimental. A experiência HSQC (“Heteronuclear Single-Quantum Correlation”) envolve magnetização transversal durante o período t_1 , gerada por transferência de polarização dos prótons ligados via sequência INEPT (“Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer”) (Figura 2.14). Consequentemente, os picos cruzados no espectro HSQC não são alargados pelos acoplamentos homonucleares ^1H - ^1H , ao longo de f1. Isto resulta numa melhor resolução nesta dimensão (Bodenhausen e Ruben, 1980).

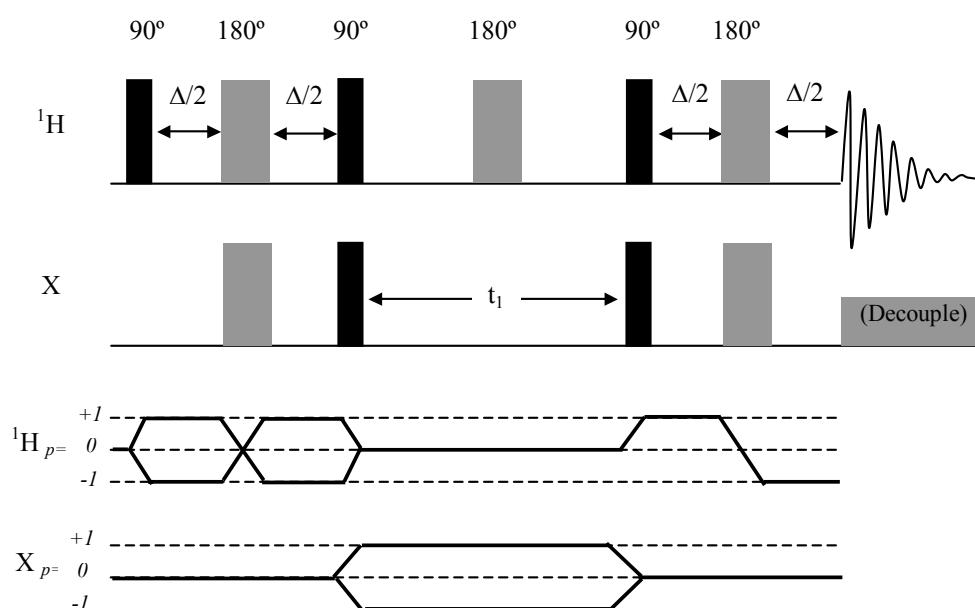


Figura 2.14 Sequência de pulsos da experiência HSQC e via de transferência de coerência.

Num espectro normal 1D de RMN ^1H , os desvios químicos e a informação do acoplamento spin-spin podem estar obscurecidos pela sobreposição dos multipletos. Na experiência 2D J -resolved, cuja sequência de pulsos se apresenta na Figura 2.15-a, estes dois parâmetros estão separados e aparecem em eixos diferentes da matriz 2D. Na dimensão f2 aparece a

informação do desvio químico, enquanto que na dimensão f1, só a informação do acoplamento spin-spin (Figura 2.15-b).

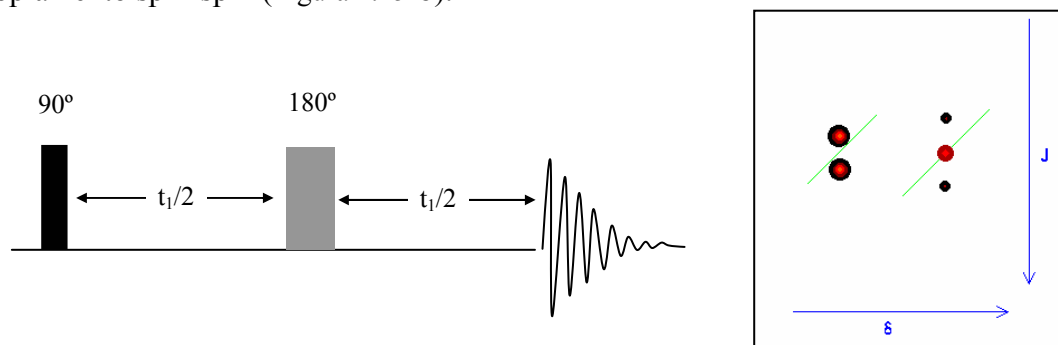


Figura 2.15 a) Sequência de pulsos da experiência *J*-resolved; b) representação esquemática de um espectro *J*-resolved.

2.3.3 Análise em Componentes Principais (PCA)

A Análise em Componentes Principais (PCA), usada na análise dos espectros de FT-IR e RMN, consiste numa factorização matricial, cujo objectivo é extrair as principais fontes de variabilidade. Cada fonte de variabilidade concretiza-se na obtenção de um eixo (componente principal – PC). Geometricamente, pode ser compreendida como uma rotação/projecção dos eixos do espaço multivariado de uma matriz, de forma a maximizar a variação ao longo de cada eixo. Estes novos eixos são denominados componentes principais ou variáveis latentes. Matematicamente, este processo consiste numa simples transformação linear das variáveis de partida, para criar k variáveis características (componentes principais) das fontes de variabilidade (Jolliffe, 1986).

Como técnica exploratória, permite a visualização dos dados após a projecção das amostras (objectos) no espaço multi-dimensional determinado pelos componentes principais. Não sendo supervisionada, não se propõe nenhuma relação *a priori* entre os objectos e/ou as variáveis, procurando ela própria as relações entre os diferentes parâmetros (objectos e variáveis), permitindo observar eventuais agrupamentos entre objectos ou variáveis

A decomposição de uma matriz $\mathbf{X}_{(n,a)}$ pela PCA pode ser formalizada da seguinte forma:

$$\mathbf{X}(n,a) = \mathbf{T}(n,k) \cdot \mathbf{P}'(k,a) + \mathbf{E}(n,a)$$

$$\boxed{\mathbf{X}} = \boxed{\mathbf{T}} \cdot \boxed{\mathbf{P}'} + \boxed{\mathbf{E}}$$

Figura 2.16 - Decomposição da matriz por PCA.

onde, **P** é a matriz das contribuições factoriais (“loadings”), **T** a matriz das coordenadas factoriais (“scores”), **E** a matriz de erro, **n** o número de amostras (objectos), **a** o número de variáveis e **k** o número de componentes principais. A matriz de contribuições factoriais define o novo sistema de eixos e a de coordenadas factoriais representa a posição de cada amostra (objecto) quando projectada nesse novo espaço vectorial. As contribuições factoriais são obtidas para cada uma das variáveis (coluna) da matriz **X** e representam a relação entre as variáveis originais e os componentes principais. As coordenadas factoriais – projecção de cada amostra no espaço dos componentes principais – podem ser obtidos para todos os objectos em todos os componentes principais, da seguinte forma:

$$\mathbf{T}(n,k) = \mathbf{X}(n,a) \cdot \mathbf{P}(a,k)$$

$$\boxed{\mathbf{T}} = \boxed{\mathbf{X}} \cdot \boxed{\mathbf{P}}$$

Figura 2.17 - Projecções dos dados nos componentes principais.

Os gráficos das coordenadas factoriais podem mostrar relações entre as amostras, agrupando-as ou dispondo-as ao longo dos componentes principais. Relacionando os gráficos de dispersão das coordenadas factoriais com os das contribuições factoriais correspondentes às mesmas dimensões, pode estudar-se o comportamento das amostras com as variáveis que têm maior importância em cada componente principal. Estas dimensões são as que maximizam a variabilidade entre as amostras, devendo ser, eventualmente, desprezadas as outras dimensões, que podem conter apenas variabilidade não estruturada (ruído) ou não informativa.

Os componentes principais são mutuamente perpendiculares e a cada um destes está associado um valor próprio (medida da sua variabilidade), sendo decrescente à medida que vão sendo calculados novos componentes.

Referências

Bodenhausen, G.; Ruben, D. – “Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy” – Chemical Physics Letters; 69; 185-188; 1980.

Braunschweiler, L.; Bodenhausen, G.; Ernst, R. – “Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy” – Journal of Magnetic Resonance; 53; 521-528; 1983.

Claridge, T. D. W. – “High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry” – Elsevier science; Oxford; 1999.

Fan, T.W. – “Metabolite profiling by one and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures” – Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; 28; 161-219; 1996.

Harris, R. K. – “Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy” – 3rd Ed.; John Wiley & Sons; New York; 1987.

Hughes, P.S.; Baxter, E.D. – “Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects” – The Royal Society of Chemistry; Cambridge; 2001.

Jolliffe, I.T. – “Principal Component Analysis” – Springer-Verlag; New York; 1986.

Kellner, R.; Mermet, J. M.; Otto, M.; Widmer, H. M. – “Analytical Chemistry – the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry” – Wiley-VCH, Germany, 1998.

Lachenal, G. – “Introduction à la spectroscopie infrarouge” – Collection Sciences & Technologies Agroalimentaires; Paris; 2000.

Lea, A. ; Piggott, J. – “Fermented Beverage Production” – Blackie Academic & Professional; Glasgow; 1995.

Lewis, M. J.; Young, T. W. – “Brewing” – Chapman & Hall; London; 1996.

Morrisson, R.; Boyd, R. – “Química Orgânica” – 13ª ed.; Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa; 1992.

Nicholson, J.K.; Foxall, P.J. – “750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR Spectroscopy of human blood plasma” – Analytical Chemistry; 67; 793-811; 1995.

Nord, L.; Sorensen, S.; Duus, J. – “Characterization of reduced iso- α -acids derived from hops (*Humulus lupulus*) by NMR” – Magnetic Resonance in Chemistry; 41; 660-670; 2003.

“O Mundo da Cerveja” – Ediciones Orbis, S.A.; Espanha; 2001.

Pavia, L.; Lampman, M.; Kriz, S. – “Introduction to Spectroscopy” – 2nd ed.; Harcourt Brace College Publishers; 1996.

Perkins, W.D. – “Fourier Transform – Infrared Spectroscopy: Part I - Instrumentation” – Journal of Chemical Education; 63; 1; 1986.

Perkins, W.D. – “Fourier Transform – Infrared Spectroscopy: Part II e III” – Journal of Chemical Education; 64; 11 e 12; 1987.

Pollock, J. R. A. – “Brewing Science” – Vol. 2; Academic Press; London, 1981.

Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. – “Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds” – Springer-Verlag; Berlin; 1989.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. – “Principles of Instrumental Analysis” – 5th ed.; Saunders College Publishing; U.S.A.; 1998.

Smith, B. C. – “Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy” – CRC Press; 1996.

Stuart, B.; George, B.; McIntyre, P. – “Modern Infrared Spectroscopy” – John Wiley & Sons; UK; 1996.

União Cervejeira, E. P. – “A Cerveja” – Serviço de Relações Públicas da UNICER. Leça do Balio, 1993.

3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERVEJA POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

3.1	<i>Introdução.....</i>	44
3.2	<i>Materiais e Métodos</i>	45
3.3	<i>Análise dos Espectros de RMN 1D e 2D</i>	46
3.4	<i>Conclusões</i>	53
	Referências	53

3.1 Introdução

A cerveja é uma mistura complexa, cuja composição química depende de vários factores, incluindo a qualidade da água, o tipo de malte, a levedura usada, o lúpulo, assim como as condições, quer ambientais (temperatura, humidade), quer mecânicas (tipo e estado do equipamento) de todo o processo de fabrico (Hughes e Baxter, 2001). O estudo detalhado dessa composição química e da sua relação com as propriedades da cerveja é de extrema importância para se poder realizar um controlo de qualidade eficiente e melhorar as características do produto final. Este é, geralmente, avaliado através da sua aparência (cor, propriedades da espuma e turvação), do gosto (doce, salgado, ácido e amargo) e do sabor e aroma. No entanto, a relação destas propriedades com a composição química da cerveja não é inteiramente conhecida, facto que limita o controlo e conhecimento da bioquímica do produto e consequente controlo das características finais. Isto implica, necessariamente, uma caracterização química detalhada e, embora diversas metodologias analíticas sejam aplicadas na indústria cervejeira, é ainda requerida e desejável uma análise minuciosa, total e em tempo real, da composição química da cerveja.

A espectroscopia de RMN permite detectar, simultaneamente, numa única experiência, várias famílias de compostos, em diversas gamas de concentração e já mostrou elevada potencialidade no estudo da composição química de vários produtos alimentares, tais como, sumos de fruta (Belton *et al.*, 1996; Belton *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 2001), café (Bosco *et al.*, 1999), azeite (Sacchi *et al.*, 1996) e vinho (Ramos e Santos, 1999; Kosir e Kidric, 2001; Brescia *et al.*, 2002), com a vantagem de ser uma técnica não-destrutiva (a amostra é usada directamente, sem qualquer tipo de pré-tratamento). No caso da cerveja, é suficiente desgaseificar a amostra e em poucos minutos podemos obter um espectro que fornece informação detalhada sobre a sua composição química (Duarte *et al.*, 2002). A espectroscopia de RMN tem sido, maioritariamente, aplicada na resolução de problemas específicos, tais como, identificação e quantificação dos constituintes do malte e do lúpulo, por exemplo, polifenóis (Friedrich e Galensa, 2002) e iso-humulonas (Nord *et al.*, 2003) e quantificação de ácidos orgânicos e aminoácidos na cerveja (Nord *et al.*, 2004). No entanto, estes estudos recorreram ao uso de extractos de cerveja, o que possibilitou,

unicamente, o estudo detalhado de um grupo de compostos químicos, como é o caso dos polifenóis. É de todo o interesse investigar métodos que usem a cerveja intacta, não só para simplificar o procedimento experimental, como para reduzir o tempo de análise e aumentar o número de compostos analisados. Assim, o RMN de Alta Resolução acoplado com a Cromatografia Líquida e com a Espectrometria de Massa (LC-NMR a LC-NMR/MS) permitiu a identificação de oligossacarídeos (Duarte *et al.*, 2003) e compostos aromáticos (Gil *et al.*, 2003). Mesmo usando técnicas mais avançadas, como é o caso do DOSY (“Diffusion-Ordered Spectroscopy”) (Gil *et al.*, 2004), a identificação de todos os picos constantes de um espectro de RMN de cerveja intacta não é ainda possível, devido, principalmente, à forte sobreposição de sinais. Deste modo, o uso da análise estatística multivariada (Duarte *et al.*, 2004) pode ser uma ajuda na interpretação de tão complexos espectros. Recentemente, e com o objectivo de tornar o espectrómetro de RMN cada vez mais automático, foi explorado o sistema de injeção de fluxo, na troca das amostras de cerveja, durante a análise por RMN que, conjuntamente com uma base de dados de espectros, pode vir a ser adaptado como um método de análise rotineiro na indústria cervejeira (Lachenmeier *et al.*, 2005).

Com este capítulo pretende-se mostrar a metodologia usada durante esta dissertação, na identificação dos picos constantes dos espectros de RMN de cerveja intacta. Para isso, escolheu-se aleatoriamente, um conjunto de espectros 1D e 2D de uma amostra de cerveja para ilustrar o processo de interpretação dos espectros.

3.2 Materiais e Métodos

Amostra: Foi seleccionada, aleatoriamente, 1 garrafa de cerveja do tipo “lager” (4% v/v de percentagem de álcool) que foi desgaseificada num banho ultra-sónico, durante 10 minutos. A amostra foi preparada de modo a conter 10% de D₂O e 0,02% de TSP (3-(trimetilsilil)-propionato-2,2,3,3-d₄ de sódio) como referência de desvio químico e de intensidade.

Métodos: Os espectros de RMN 1D e 2D foram adquiridos num espectrómetro Bruker Avance DRX-500, operando a 500,13 MHz para o protão e a 125,77 MHz para o carbono. Os espectros de RMN 1D de ^1H foram obtidos usando o programa de pulsos ‘noesypr1dsp’, com saturação dos sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,64 ppm). Foram usados 128 varrimentos e 32K pontos, com uma largura espectral de 8012 Hz. Os espectros TOCSY (“Total Correlation Spectroscopy”) foram registados usando o programa ‘lcmlevpcpstp’ (“Bruker Library”) e a sequência de pulsos MLEV-17 para “spin-lock”. Foram adquiridos 16 varrimentos para cada um dos 512 incrementos, usando uma largura espectral de 5482,46 Hz, nas duas dimensões, um tempo de relaxação de 100 ms e um tempo de mistura de 1,5 segundos. Os espectros de HSQC (“Heteronuclear Single-Quantum Correlation”) foram registados usando o programa ‘invietgpsi’ que utiliza a detecção inversa e o desacoplamento de ^{13}C durante a aquisição. Foram obtidos 64 varrimentos para cada um dos 300 incrementos que foram adquiridos com uma largura espectral de 5482,46 Hz e 25157,23 Hz, nas dimensões do protão e do carbono, respectivamente. Os espectros *J*-resolved foram registados usando o programa ‘lcjresps’, com 8182 pontos, 24 varrimentos para cada um dos 128 incrementos e uma largura espectral de 8012,82 Hz, na dimensão do protão e 31,30 Hz na dimensão *J*.

3.3 Análise dos Espectros de RMN 1D e 2D

A Figura 3.1 representa o espectro de RMN ^1H 1D de uma amostra de cerveja, adquirido a 500 MHz, com supressão dos sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,64 ppm), por serem os compostos maioritários. Como se pode ver, os três sinais mais intensos reflectem estes 2 compostos, enquanto que os sinais mais fracos são os da região aromática (5,8-10 ppm), que se encontra expandida na figura. Esta região mostra um elevado número de sinais provenientes de diversos compostos aromáticos. A região alifática (0-3 ppm), onde surgem, principalmente, sinais de ácidos orgânicos e aminoácidos, mostra sinais fracos, com alguma sobreposição, enquanto que na região dos açúcares (3-5,8 ppm) os sinais são intensos e largos, com forte sobreposição, devido à similaridade entre os ambientes químicos caracterizando os vários protões.

Devido à elevada complexidade do espectro e sobreposição de sinais, a identificação dos mesmos não é fácil e por isso é necessário recorrer a técnicas 2D, técnicas acopladas e análise estatística multivariada (Duarte *et al.*, 2002).

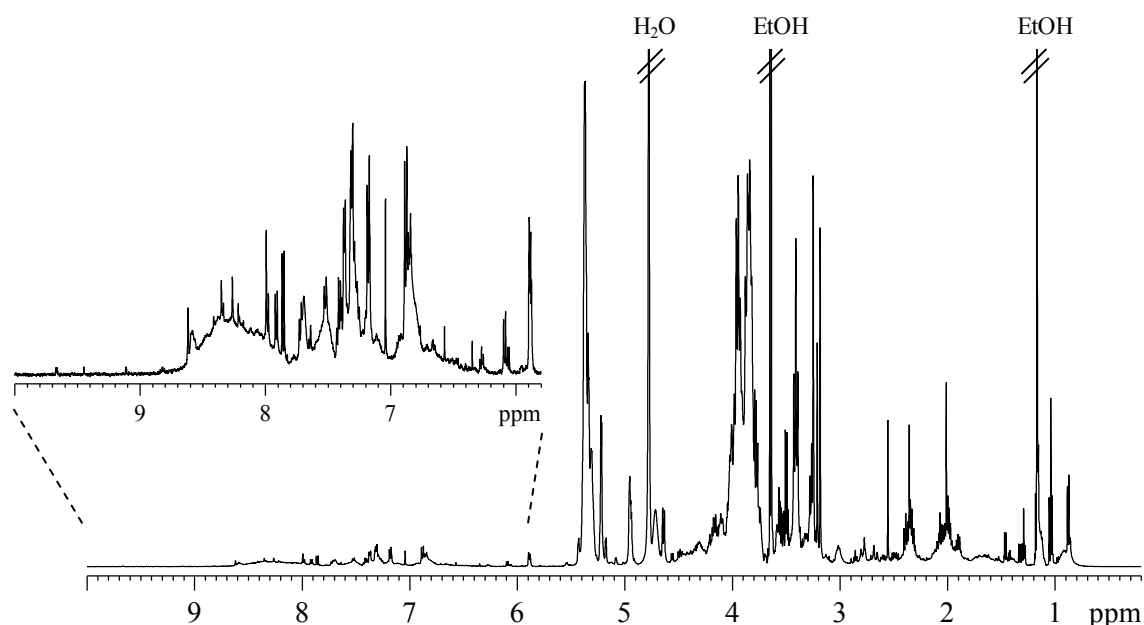


Figura 3.1 Espectro 1D típico de RMN de ^1H de uma cerveja, registrado a 500 MHz.

Para identificar a maior parte dos sinais presentes na Figura 3.1, foram combinados os dados das experiências de TOCSY, Correlação ^1H - ^{13}C (HSQC) e *J*-Resolved.

Na Figura 3.2 estão representados os espectros de RMN de ^1H 1D e 2D (TOCSY) de uma amostra de cerveja, adquiridos no mesmo espectrómetro que o espectro anterior e também com supressão tripla. Podem-se observar sinais de vários compostos, nomeadamente, álcoois (isopentanol, isobutanol e propanol), aminoácidos (prolina, histidina, fenilalanina e alanina), ácidos orgânicos (acético, pirúvico, succínico, cítrico e málico) e nucleósidos (uridina, citidina, adenosina e inosina). Estes sinais foram identificados com base em trabalhos anteriores (Duarte *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2003) e encontram-se na Tabela 3.1.

Aquando da interpretação de um espectro de TOCSY é necessário ter presente o espectro 1D da amostra respectiva e ir identificando os sinais de prótons com acoplamento com prótons vizinhos, ou seja, os dupletos, tripletos, etc., pois só estes são visíveis no TOCSY. Em seguida é necessário encontrar os sistemas de spin respectivos, ou seja, o conjunto de

picos cruzados pertencentes a uma mesma molécula (ou sistema de spin) e ir consultando as bases de dados que existem de vários compostos orgânicos (Fan, 1996). A experiência de TOCSY é um dos métodos mais úteis na identificação de compostos pois permite a detecção de acoplamentos escalares ao longo de várias ligações e assim a identificação de vários grupos de uma mesma molécula.

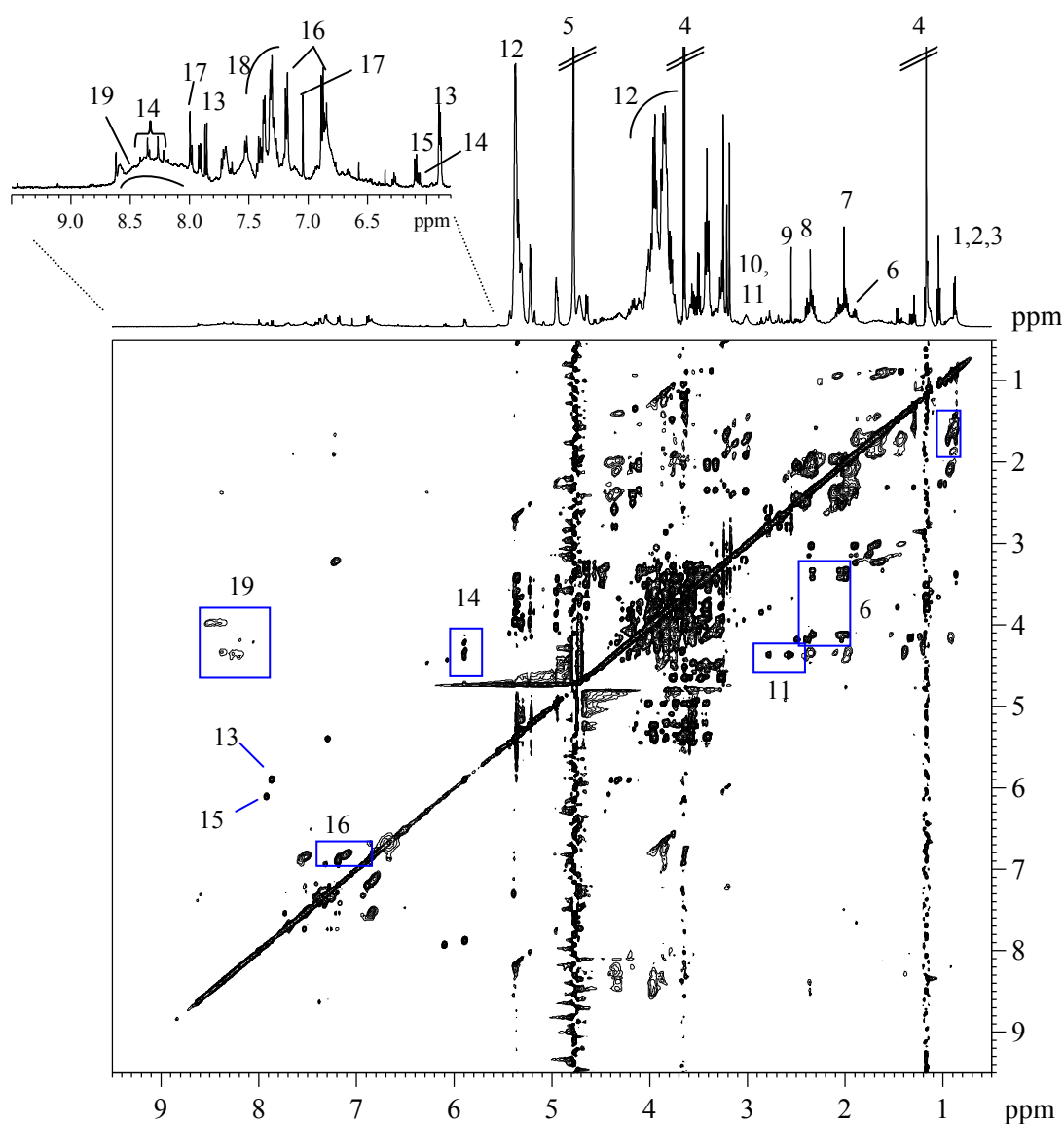


Figura 3.2 Espectros de RMN ^1H 1D e 2D (TOCSY) de uma cerveja (1-propanol, 2-isobutanol, 3-isopentanol, 4-etanol, 5- H_2O , 6-prolina, 7-acético, 8-pirúvico, 9-succínico, 10-cítrico, 11-málico, 12-dextrinas, 13-uridina, 14-adenosina/inosina, 15-citidina, 16-tirosina/tirosol, 17-histidina, 18-fenilalanina, 19-polifenóis).

Na Figura 3.3 está representada uma expansão do espectro de TOCSY onde se podem observar os picos cruzados da zona alifática (0-3 ppm) e da zona dos açúcares (3-5,5 ppm). Na região alifática observam-se os sinais dos ácidos orgânicos (acético, pirúvico e succínico), provenientes do ciclo de Krebs e de alguns aminoácidos, estes em pequenas quantidades, por serem consumidos pelo metabolismo das leveduras. Na região dos açúcares é de notar a forte sobreposição de sinais e daí a dificuldade de identificação. Na zona anomérica (4,4-5,5 ppm) é possível identificar o duplete a 4,64 ppm proveniente da ligação H1 β de açúcares redutores, enquanto que a 5,22 ppm se encontra o duplete da ligação H1 α . O sinal largo a 5,3-5,4 ppm é característico de dextrinas, que por serem moléculas maiores não são facilmente fermentáveis pela levedura.

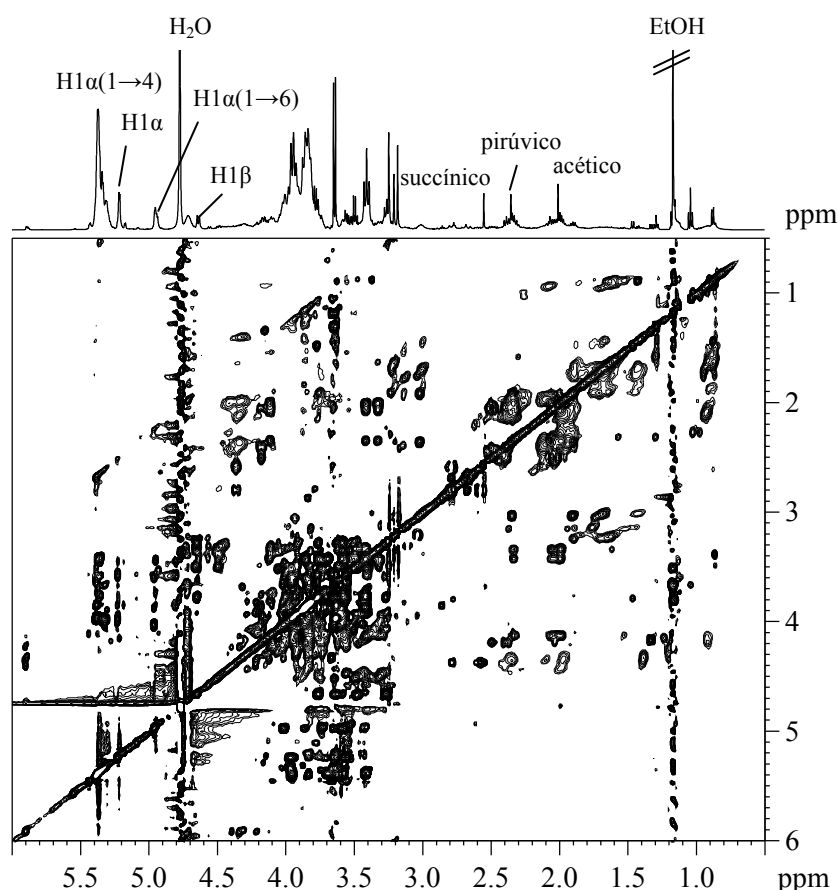


Figura 3.3 Expansão do espectro de TOCSY (0-6 ppm) de uma cerveja.

Na região aromática (5,8-9 ppm) os sinais são fracos e provenientes de compostos aromáticos, nomeadamente aminoácidos (fenilalanina e tirosina), nucleósidos (citidina, adenosina e uridina) e alcoóis (tirosol e feniletanol).

A Figura 3.4 representa um espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC). Este tipo de espectro mostra a correlação entre os desvios químicos dos prótons e dos carbonos que lhes estão ligados. Permite, assim, a confirmação da identificação dos compostos, adquirida pela análise dos espectros 1D e TOCSY e é especialmente útil na identificação de singletos no espectro 1D.

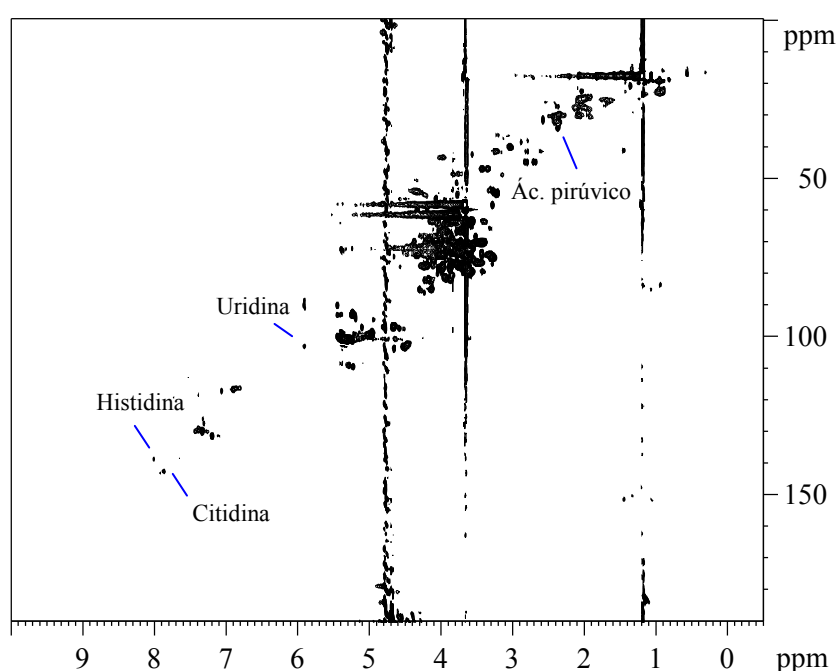


Figura 3.4 Espectro de HSQC, 500 MHz de uma cerveja.

A experiência *J*-resolved é particularmente útil na determinação da constante de acoplamento dos multipletos, que aparecem sobrepostos ou de baixa resolução no espectro 1D. Na Figura 3.5 está representado um espectro *J*-resolved de uma cerveja, a título exemplificativo, para mostrar o tipo de informação fornecida.

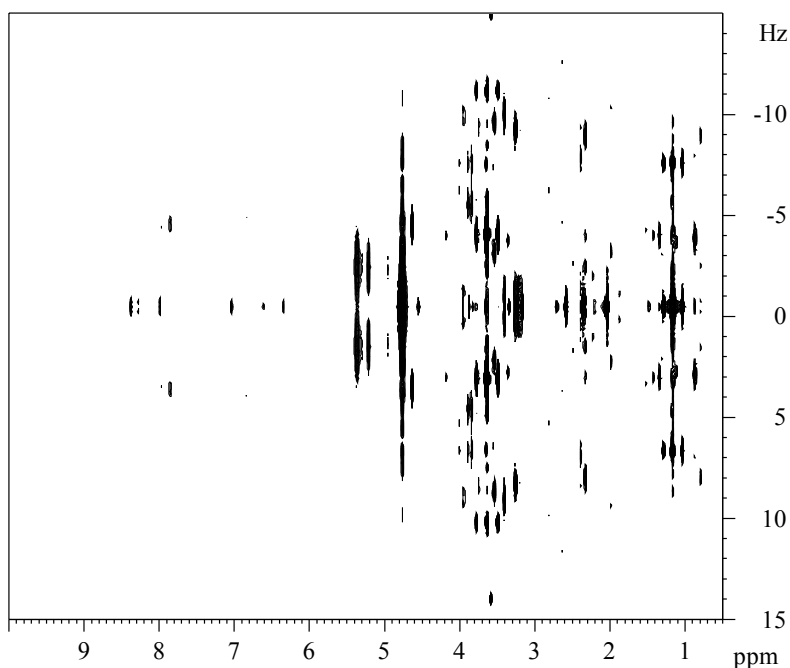


Figura 3.5 Espectro J -resolved, 500 MHz de uma cerveja.

Tabela 3.1 Desvios químicos de ^1H e ^{13}C , multiplicidade e constante J_{HH} dos compostos identificados na cerveja. s: singuleto, d: duplete, t: tripeto, q: quarteto, dd: duplo duplete, m: multipeto, ^(a) identificação possível, n.i.: não identificado.

Composto	Atribuição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
Ácido Acético	βCH_3	2,01	s		23,82
Ácido Cítrico	$\alpha, \gamma\text{CH}$	2,72	d	15,7	46,50
	$\alpha', \gamma'\text{CH}$	2,84	d	15,7	
Ácido γ -Aminobutírico (GABA)	βCH_2	1,92			26,28
	αCH_2	2,39	t	7,2	32,28
	γCH_2	3,02	t	7,2	41,83
Ácido Láctico	CH_3	1,34	d	7,0	22,48
	αCH	4,19	q	7,0	70,87
Ácido Málico	βCH	2,63	dd	7,5;16,2	42,78
	$\beta'\text{CH}$	2,82	dd	4,4;16,1	
	αCH	4,38			71,20
Ácido Pirúvico	βCH_3	2,35	s		29,12
Ácido Succínico	$\alpha, \beta\text{CH}_2$	2,56	s		32,79
Adenosina/Inosina	C4'H, ribose	4,27			
	C3'H, ribose	4,41			
	C2'H, ribose	4,79			
	C1'H, ribose	6,06	d		
	C8H, anel	8,27	s		
	C2H, anel	8,35	s		
Alanina	βCH_3	1,48	d	7,2	
	αCH	3,77			

Composto	Atribuição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
Citidina	C1'H, ribose	5,86			
	C6H, anel	6,09	d	7,9	98,36
	C5H, anel	7,92	d	7,9	145,72
Etanol	CH ₃	1,17	t	7,2	19,56
	CH ₂	3,64	q	7,2	60,19
Fenilalanina	C3H, C5H, anel	7,31			
	C4H, anel	7,37			
	C2H, C6H, anel	7,41			
Histidina	C4H, anel	7,04	s		119,00
	C2H, anel	7,99	s		140,62
Isobutanol	CH ₃	0,87	d	6,6	
	CH	1,73			
	CH ₂ OH	3,36	d	6,5	
Isoleucina	δCH_3	0,92			
	$\gamma'\text{CH}_3$	1,00			
	γCH	1,25	t		
	$\gamma'\text{CH}$	1,46	d		
	βCH	1,96			
	αCH	3,64			
Isopentanol	CH ₃	0,88			
	CH	1,42	d	6,6	24,60
	CH ₂	1,64			
	CH ₂ OH	3,63			
Leucina	$\delta, \delta' \text{CH}_3\beta$	0,94			
	CH ₂ , γCH	1,70			
Malto-oligossacarídeos	βC1H (red.)	4,64	d	8,0	98,50
	αC1H (red.)	5,22	d	3,7	94,58
	C1H $\alpha(1-6)$	4,96			101,28
	C1H $\alpha(1-4)$	5,3-5,4			~102
Polifenóis (a)	n.i.	6,84			
	n.i.	7,51			
Prolina	γCH_2	2,00	m		26,60
	$\beta'\text{CH}$	2,06	m		31,70
	βCH	2,33	m		31,70
	$\delta'\text{CH}$	3,32			48,90
	δCH	3,41			48,90
	αCH	4,11			64,06
Propanol	CH ₃	0,88	t	7,5	13,7
	CH ₂	1,53	m		26,9
	CH ₂ OH	3,54	t	5,8	62,46
Tirosina / Tirosol	C3H, C5H, anel	6,81 6,89	d	8,5	118,2 118,2
	C2H, C6H, anel	7,11 7,18	d	8,5	133,3 133,1
Tryptofano	C5H, anel	7,15			
	C6H, anel	7,24			
	C7H, anel	7,50			
	C4H, anel	7,69			114,49
Uridina	C4'H	4,11			
	C3'H	4,21			
	C2'H	4,38			
	C5H, anel	5,88	d	8,2	105,00
	C1'H	5,89			90,51
	C6H, anel	7,86	d	8,2	144,56

Pela análise da tabela anterior podemos constatar que cerca de 25 compostos foram identificados na cerveja em estudo, por RMN 1D e 2D. Além disso, muitos outros compostos (sistemas de spin) foram encontrados mas a sua identificação requer mais investigação e recurso a outras técnicas, nomeadamente, LC-NMR, LC-NMR/MS e DOSY, devido não só à fraca intensidade de alguns sinais, como à forte sobreposição de outros.

3.4 Conclusões

Como se constatou ao longo deste capítulo, a análise detalhada de todos os picos presentes num espectro de RMN de cerveja é um processo moroso e que está longe do seu fim, uma vez que ainda existem muitos picos não identificados. No entanto, este estudo é essencial para qualquer investigação/análise de amostras de cerveja, pois permite a construção de bases de dados e a caracterização química/perfil de uma amostra, que irão facilitar a interpretação dos resultados de PCA, por exemplo.

A análise de espectros 1D e 2D exige o recurso a pessoas altamente especializadas, um grande dispêndio de tempo, o que torna o estudo oneroso. No entanto, depois de construídas as bases de dados, a utilização da técnica de RMN poderá tornar-se mais acessível, não sendo necessário pessoas tão especializadas, nem um dispêndio de tempo tão grande. Além disso, o uso de automação no registo dos espectros e o recurso a métodos estatísticos poderá facilitar o acesso às indústrias.

Referências

Belton, P.; Delgadillo, I.; Holmes, E.; Nicholls, A.; Nicholson, J.; Spraul, M. – “Use of high-field ^1H NMR spectroscopy for the analysis of liquid foods” – Journal of Agricultural and Food Chemistry; 44; 1483-1487; 1996.

Belton, P.; Delgadillo, I.; Gil, A.; Roma, P.; Casuscelli, F.; Colquhoun, I.; Dennis, M.; Spraul, M. – “High field proton NMR studies of apple juices” – *Magnetic Resonance in Chemistry*; 35; S52-S60; 1997.

Bosco, M.; Toffanin, R.; Palo, D.; Zatti, L.; Segre, A. – “High resolution ^1H NMR investigation of coffee” – *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 79; 869-878; 1999.

Brescia, M.; Caldarola, V.; De Giglio, A.; Benedetti, D.; Fanizzi, F.; Sacco, A. – “Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations” – *Analytica Chimica Acta*; 458; 177-186; 2002.

Duarte, I.; Barros, A.; Belton, P.; Righelato, R.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Gil, A. – “High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50; 2475-2481; 2002.

Duarte, I.; Godejohann, M.; Braumann, U.; Spraul, M.; Gil, A. – “Application of NMR Spectroscopy and LC-NMR/MS to the Identification of Carbohydrates in Beer” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51; 4847-4852; 2003.

Duarte, I.; Barros, A.; Almeida, C.; Spraul, M.; Gil, A. – “Multivariate Analysis of NMR and FT-IR Data as a Potential Tool for the Quality of Beer” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52; 1031-1038; 2004.

Fan, T. – “Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures” – *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*; 28; 161-219; 1996.

Friedrich, W.; Galensa, R. – “Identification of a new flavanol glucoside from barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt” – *European Food Research and Technology*; 214; 388-393; 2002.

Gil, A.; Duarte, I.; Godejohann, M.; Braumann, U.; Maraschin, M.; Spraul, M. – “Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection” – *Analytica Chimica Acta*; 488; 35-51; 2003.

Gil, A.; Duarte, I.; Cabrita, E.; Goodfellow, B.; Spraul, M.; Kerssebaum, R. – “Exploratory applications of Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) to liquid foods: an aid towards spectral assignment” – *Analytica Chimica Acta*; 506(2); 215-223; 2004.

Hughes, P.S.; Baxter, E.D. – “Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects” – The Royal Society of Chemistry; Cambridge; 2001.

Kosir, I.; Kidric, J. – “Identification of amino acids in wines by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49; 50-56; 2001.

Lachenmeier, D. W.; Frank, W.; Humpfer, E.; Schafer, H.; Keller, S.; Mortter, M.; Spraul, M. – “Quality Control of Beer using High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis” – *European Food Research and Technology*; 220; 215-221; 2005.

Le Gall, G.; Puaud, M.; Colquhoun, I. – “Discrimination between orange juice and pulp wash by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49; 580-588; 2001.

Nord, L.; Sorensen, S.; Duus, J. – “Characterization of reduced iso- α -acids derived from hops (*Humulus lupulus*) by NMR” – *Magnetic Resonance in Chemistry*; 41; 660-670; 2003.

Nord, L.; Vaag, P.; Duus, J. – “Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by ^1H NMR Spectroscopy” – *Analytical Chemistry*; 76; 4790-4798; 2004.

Ramos, A.; Santos, H. – “NMR studies of wine chemistry and wine bacteria” – In Annual Reports on NMR Spectroscopy; Webb, G.A. Ed.; Academic Press; London; 179-202; 1999.

Sacchi, R.; Patumi, M.; Fontanazza, G.; Barone, P.; Fiordiponti, P.; Mannina, L.; Rossi, E.; Segre, A. – “A high-field ^1H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils” – Journal of the American Oil Chemists Society; 73; 747-758; 1996.

4 DETERMINAÇÃO DO PAÍS E DATA DE FABRICO DE CERVEJAS PRODUZIDAS INTERNACIONALMENTE

4.1	<i>Introdução.....</i>	58
4.2	<i>Materiais e Métodos</i>	60
4.3	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de FT-IR.....</i>	63
4.4	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN.....</i>	66
4.5	<i>Conclusões</i>	89
	Referências	91

4.1 Introdução

Hoje em dia, assegurar a autenticidade de um determinado produto é de extrema importância, não só porque o consumidor final é cada vez mais exigente, como também porque a concorrência é cada vez mais desleal. Para garantir a autenticidade é necessário ferramentas que permitam determinar/confirmar a origem/local de fabrico, assim como o tipo de matérias-primas usadas e condições de processamento.

Várias técnicas têm sido usadas na determinação e classificação de alimentos líquidos, nomeadamente, vinho, chá, vinagre e sumos de fruta, segundo a sua origem geográfica. Assim, por exemplo, a determinação por HPLC do conteúdo em catequinas, ácidos fenólicos e alcalóides e a PCA foram usados para distinguir o chá (Fernández *et al.*, 2002) segundo a sua origem geográfica. A relação entre a concentração de metais vestigiais no chá, determinada por ICP-AES (“*inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*”) e por ICP-MS (“*inductively coupled plasma mass spectrometry*”) e a origem geográfica foram objecto de estudo no Reino Unido (Marcos *et al.*, 1998). Estes métodos também serviram para classificar o vinho consoante a sua origem geográfica (Almeida *et al.*, 2001; Baxter *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2003).

A cromatografia de troca iónica foi usada para classificar o vinho tinto e branco produzido na Hungria, com base no conteúdo dos aminoácidos livres e biogénicos (Héberger *et al.*, 2003) enquanto que a cromatografia em fase gasosa capilar foi usada para determinar os polialcóóis no vinagre, como um factor discriminante da sua origem (Antonelli *et al.*, 1997). Mas, estes métodos requerem elevados tempos de preparação da amostra antes da sua análise. A separação, a derivatização e a pré-concentração, no caso dos compostos de baixa concentração, são geralmente etapas comuns no procedimento. Assim, é importante desenvolver métodos que possam fornecer a informação rápida sobre vários factores, tais como, a origem geográfica, condições de processamento e a composição química.

Nos vinhos é frequente acontecerem adulterações, nomeadamente a adição de açúcares sintéticos para aumentar o teor alcoólico e consequente valor comercial do produto. Como se sabe, de um modo geral, os átomos existem em múltiplas formas isotópicas. Além disso, os elementos mais abundantes como o hidrogénio, carbono, oxigénio e azoto, estão sempre acompanhados de quantidades significativas dos seus isótopos. Na natureza a distribuição

isotópica não é aleatória, antes pelo contrário, ela é característica de cada planta e de cada região. A razão Deutério/Hidrogénio, D/H, diminui à medida que a latitude aumenta, e também, com o aumento da distância em relação ao mar. O vapor de água é pobre em deutério durante a formação das nuvens, relativamente à água do mar. Mas assim que o vapor de água se condensa, a chuva resultante torna-se rica em deutério. Estes isótopos vão actuar como marcadores naturais dos açúcares biossintetizados nas plantas e funcionar como uma impressão digital deixada no álcool proveniente da biofermentação desses açúcares (Cross *et al.*, 1998). A razão isotópica D/H nos grupos metilo e metileno do etanol do vinho pode ser determinada por “Site-specific Natural Isotope Fractionation NMR” (SNIF-NMR). A comparação da razão D/H com a razão (*R*) da intensidade dos sinais do metilo e do metileno no espectro de deutério possibilita a distinção entre vinhos naturais e vinhos enriquecidos em etanol e ainda a diferenciação baseada na origem geográfica (Košir *et al.*, 2001). No entanto, com o avançar da tecnologia, várias práticas enológicas surgiram de modo a despistar a detecção da adição de etanol por SNIF-NMR. Assim, para atingir o mesmo objectivo, de aumentar o teor alcoólico, passou-se a adicionar sacarose proveniente da beterraba e da cana do açúcar. Mas esta adulteração também é detectável através da determinação da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) por “Isotope Ratio Mass Spectrometry” (IRMS). Comparando os dados das amostras analisadas, com uma base de dados de parâmetros isotópicos (D/H)_I, (D/H)_{II}, *R* e $\delta^{13}\text{C}$ de amostras autênticas, é possível confirmar a adição de açúcares ao mosto ou ao vinho antes ou durante a fermentação. Este método foi aplicado aos vinhos produzidos na Eslovénia, onde os dados dos isótopos estáveis foram analisados por PCA e LDA (“*linear discriminant analysis*”) (Ogrinc *et al.*, 2001; Košir *et al.*, 2001).

Há cerca de 25 anos atrás, também a razão isotópica de carbonos estáveis foi determinada na cerveja, com o objectivo de detectar a adição de malte de milho, proibida segundo as leis alemãs de pureza de cerveja. Com o objectivo de determinar a origem do malte, foi determinada a razão D/H do grupo metileno do etanol da cerveja, por ser considerada um bom indicador da sua origem geográfica (Rossmann, 2001).

A espectroscopia de RMN acoplada com outros métodos, como o HPLC e a espectrometria de massa também já demonstraram utilidade na distinção e classificação, segundo a origem geográfica, de vinho, sumos de fruta e azeite (Brescia *et al.* 2002; Ogrinc *et al.*, 2003). No

entanto, com este capítulo, pretende-se avaliar o potencial das técnicas espectroscópicas de FT-IR e RMN acopladas com métodos quimiométricos, na análise de amostras de cerveja, com os principais objectivos de estudar a influência da origem/local de fabrico da cerveja na composição química e possível identificação da data de produção (Almeida *et al.*, 2006). A abordagem pretendida é diferente dos estudos anteriores relatados uma vez que se pretende caracterizar minuciosamente a cerveja e depois relacionar essa caracterização com a origem e data de produção. Em cada local, mesmo que seja seguida uma mesma receita (bioquímica e técnica) é difícil prever e detectar, em tempo útil, variações na composição e propriedades gerais da cerveja, provocadas por alterações das condições ambientais, estado da levedura e dos equipamentos, etc. Assim, pretende-se tirar partido da rapidez do RMN e da sua capacidade de registar um perfil geral da composição química da cerveja para facilitar e promover um controlo de qualidade mais eficiente.

4.2 Materiais e Métodos

Amostras: Foram seleccionadas 27 garrafas de cerveja do tipo “lager” (4% v/v de percentagem de álcool) e da mesma marca, produzidas em 3 países (A, B e C) e em 3 datas diferentes (1, 2 e 3), espaçadas de 1-2 meses. De cada data de fabrico, seleccionaram-se 3 garrafas (a, b e c), como se pode ver na Tabela 4.1, de forma a, no decorrer do estudo, avaliar e considerar a eventual variabilidade entre garrafas produzidas na mesma data. As amostras foram armazenadas a 4°C até à sua análise.

Tabela 4.1 Informação sobre as amostras de cerveja analisadas.

Codificação	País de Origem	Data de Produção	Garrafa	pH
A1a	A	Mar-02	a	4,37
A1b	A	Mar-02	b	4,35
A1c	A	Mar-02	c	4,35
A2a	A	Abr-02	a	4,35
A2b	A	Abr-02	b	4,38
A2c	A	Abr-02	c	4,37
A3a	A	Fev-02	a	4,40
A3b	A	Fev-02	b	4,41
A3c	A	Fev-02	c	4,39

Codificação	País de Origem	Data de Produção	Garrafa	pH
B1a	B	Mai-02	a	4,32
B1b	B	Mai-02	b	4,32
B1c	B	Mai-02	c	4,30
B2a	B	Mar-02	a	4,27
B2b	B	Mar-02	b	4,28
B2c	B	Mar-02	c	4,28
B3a	B	Fev-02	a	4,37
B3b	B	Fev-02	b	4,36
B3c	B	Fev-02	c	4,36
C1a	C	Fev-02	a	4,22
C1b	C	Fev-02	b	4,21
C1c	C	Fev-02	c	4,24
C2a	C	Mar-02	a	4,35
C2b	C	Mar-02	b	4,32
C2c	C	Mar-02	c	4,34
C3a	C	Abr-02	a	4,54
C3b	C	Abr-02	b	4,53
C3c	C	Abr-02	c	4,53

Imediatamente antes da análise por RMN, as amostras de cerveja foram desgaseificadas num banho ultra-sónico, durante 10 minutos e preparadas de modo a conterem 10% de D₂O e 0,02% de TSP, como referência de desvio químico e de intensidade. As mesmas amostras desgaseificadas foram armazenadas a 4°C, durante 3-4 dias, até serem analisadas por FT-IR.

Métodos: Para a análise por Espectroscopia de FT-IR, as amostras de cerveja desgaseificadas foram colocadas directamente sob a célula de FT-IR-ATR (Golden Gate, equipada com um cristal de diamante, que permite uma reflexão única). Os espectros de FT-IR foram registados num espectrómetro Bruker IFS55, usando uma resolução de 4 cm⁻¹ e 256 varrimentos para cada amostra. De cada amostra obtiveram-se 5 espectros/réplicas (para verificar a repetibilidade experimental dos resultados), que depois foram tratados por Análise em Componentes Principais (PCA). Entre cada análise, o cristal foi limpo cuidadosamente com acetona e água destilada e efectuou-se um “background”, ou seja, foi adquirido um branco da amostra. Os espectros das amostras foram registados aleatoriamente.

Os espectros de RMN 1D e 2D foram adquiridos num espectrómetro Bruker Avance DRX-500, operando a 500,13 MHz para o protão e a 125,77 MHz para o carbono. Os espectros de RMN 1D de ^1H foram obtidos usando o programa de pulsos “noesypr1dsp”, com saturação dos sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,64 ppm). Foram usados 128 varrimentos e 32K pontos, com uma largura espectral de 8012 Hz. Para cada amostra foram obtidos 3 espectros/réplicas. Os espectros TOCSY foram registados usando o programa “lcmlevpcpstp” (“Bruker Library”) e a sequência de pulsos MLEV-17 para “spin-lock”. Foram adquiridos 16 varrimentos para cada um dos 512 incrementos, usando uma largura espectral de 5482,46 Hz, nas duas dimensões, um tempo de relaxação de 100 ms e um tempo de mistura de 1,5 segundos. Os espectros de HSQC foram registados usando o programa “invietgpsi” que aplica detecção inversa e desacoplamento de ^{13}C durante a aquisição. Foram obtidos 64 varrimentos para cada um dos 300 incrementos que foram adquiridos com uma largura espectral de 5482,46 Hz e 25157,23 Hz, nas dimensões do protão e do carbono, respectivamente. Os espectros *J*-resolved foram registados usando o programa “lcrjresps”, com 8182 pontos, 24 varrimentos para cada um dos 128 incrementos e uma largura espectral de 8012,82 Hz, na dimensão do protão e 31,30 Hz na dimensão *J*.

Para a Análise em Componentes Principais (PCA) foram construídas matrizes dos espectros das amostras, de diferentes dimensões. No caso dos espectros de FT-IR, a matriz foi construída usando apenas a região da impressão digital (“fingerprint”), isto é, de 1200 a 980 cm^{-1} . Cada linha da matriz (cada espectro) foi centrada e reduzida, antes da aplicação da PCA. Na análise dos espectros de RMN, foram usados os espectros inteiros (0,5 a 10,4 ppm), excluindo os sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,65 ppm), seguindo-se a análise das sub-regiões dos espectros – alifática (3,1 – 0,5 ppm), açúcares (5,8 – 3,1 ppm) e aromática (10 – 5,8 ppm). Estas matrizes foram depois normalizadas e tratadas usando um programa estatístico co-desenvolvido pela Universidade de Aveiro e o Institut National Agronomique Paris-Grignon (Barros, 1999).

4.3 Análise dos Dados de Espectroscopia de FT-IR

Na Figura 4.1 está representado um espectro típico de FT-IR de uma amostra de cerveja. Como se pode verificar, para além das fortes bandas de absorção da água (extensão - 3320 cm^{-1} e torção - 1640 cm^{-1}), os espectros de FT-IR das cervejas apresentam alguns picos na zona de $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (zona da impressão digital), originados essencialmente por hidratos de carbono ($1155\text{-}1151\text{ cm}^{-1}$ e $1024\text{-}998\text{ cm}^{-1}$) e etanol (1087 cm^{-1} , 1045 cm^{-1} e 880 cm^{-1}), como se pode consultar na Tabela 2.9.

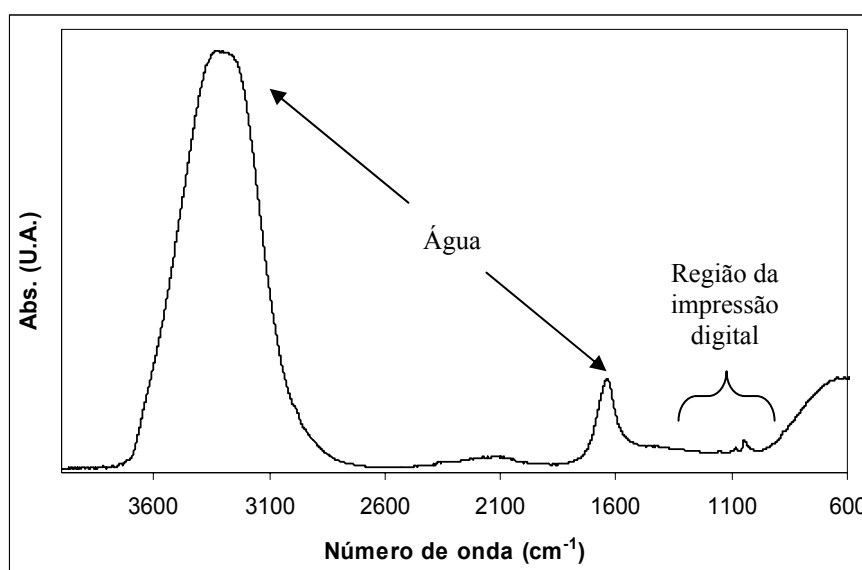


Figura 4.1 Espectro típico de FT-IR ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) de cerveja.

Na Figura 4.2a, apresentam-se ampliações da região da impressão digital, dos espectros de três amostras de cerveja, uma de cada país, produzidas no mesmo mês, como se pode ver na Tabela 4.1. Na figura, é agora possível identificar as bandas características do etanol (1087 cm^{-1} , 1045 cm^{-1}) e das dextrinas (1151 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} e 1024 cm^{-1}), tendo por base a Figura 4.2b (Duarte, 2003).

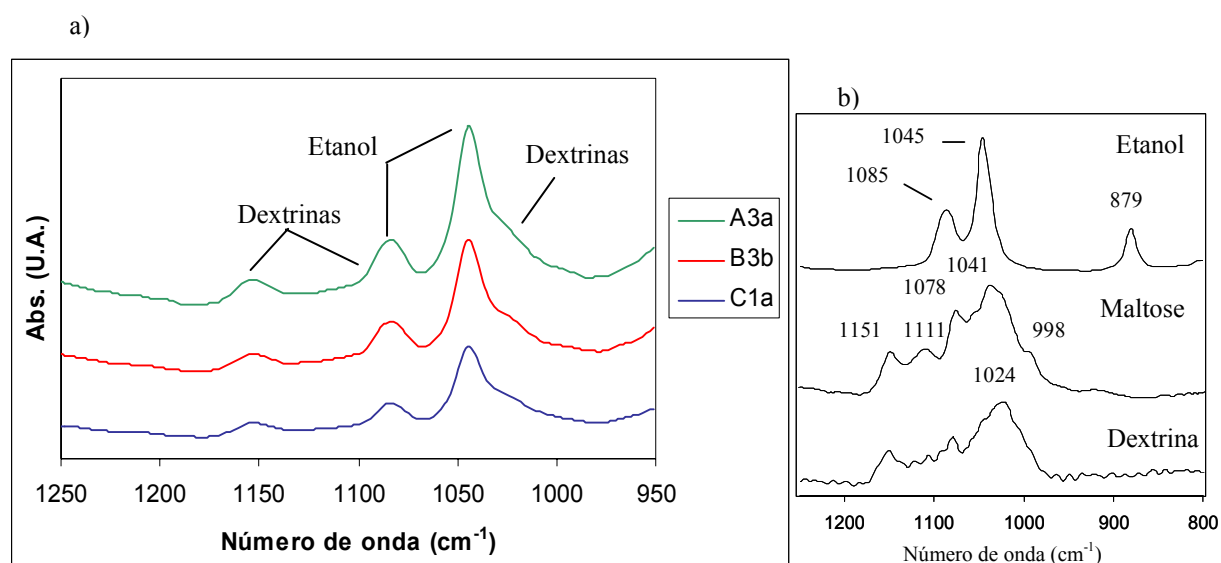


Figura 4.2 Região da impressão digital dos espectros de FT-IR de: a) amostras de cerveja, identificadas de acordo com a Tabela 4.1; b) soluções aquosas de etanol, dextrina e maltose (Duarte, 2003).

Numa primeira observação dos espectros não são visíveis diferenças assinaláveis, ao nível da composição química, entre as várias amostras. Com o objectivo de procurar e analisar as possíveis fontes de variabilidade dos espectros de FT-IR das amostras de cerveja analisadas, realizou-se uma PCA usando, a região de $1200\text{-}980\text{ cm}^{-1}$ dos espectros das 27 amostras, por ser uma região de interesse que permite detectar perfis de composição química.

Na Figura 4.3, estão representadas as coordenadas factoriais dos dois primeiros componentes principais, PC1 e PC2. Como se pode verificar, as cervejas do país B (a vermelho) encontram-se agrupadas na parte positiva do eixo PC1. Também é possível observar um agrupamento parcial das amostras do país A (a azul), sendo este efeito apenas visível para as amostras produzidas na data 3, isto é, o subgrupo A3. Este subgrupo situa-se na parte positiva do eixo de PC2 e ronda o nulo do eixo de PC1. As restantes amostras encontram-se dispersas, não havendo uma tendência para o agrupamento consoante o país de origem.

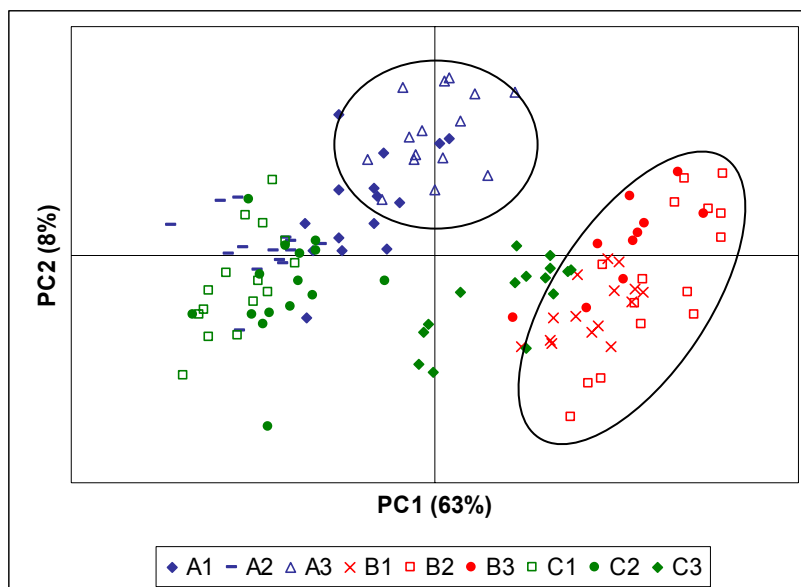


Figura 4.3 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) da região 1200-980 cm^{-1} .

No intuito de caracterizar esta separação, sugerida pelo diagrama de coordenadas factoriais, recorreu-se à análise dos gráficos das contribuições factoriais de PC1 e de PC2 (Figura 4.4).

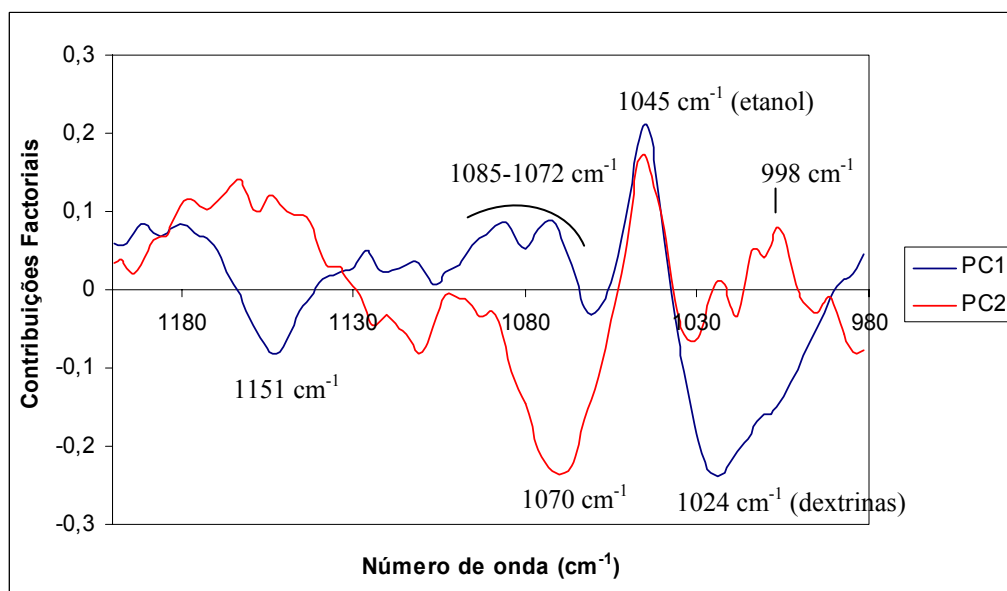


Figura 4.4 Contribuições factoriais de PC1 e PC2.

O perfil das contribuições factoriais de PC1 mostra valores positivos para bandas de absorção características do etanol (1045 e 1085-1072 cm^{-1}) e valores negativos para bandas características das dextrinas (1151 cm^{-1} e 1024 cm^{-1}), sugerindo que as cervejas produzidas no país B, localizadas na parte positiva do eixo de PC1, tenham teores mais elevados de álcool e mais baixos de dextrinas, ao contrário das amostras localizadas na parte negativa do eixo de PC1. Por outro lado, o gráfico de PC2 apresenta valores positivos para bandas de absorção características de maltose (1160-1140 cm^{-1} , 1045-1041 cm^{-1} e 998 cm^{-1}) (Duarte *et al.*, 2004), sugerindo que a variação na composição de hidratos de carbono pode ser o factor responsável pela separação das amostras A3. Estas diferenças não foram detectadas pela inspecção visual dos espectros, uma vez que o número elevado de amostras dificulta a sua comparação. Deste modo, a análise em componentes principais revelou-se uma ferramenta útil, na extracção de informação neste conjunto de dados.

A diferença nos teores de etanol e açúcares pode estar relacionada com a extensão da fermentação, uma vez que, como se sabe, um maior consumo de açúcares leva a um aumento no teor de etanol. No entanto, este assunto necessitaria de mais investigação, nomeadamente, a caracterização química mais detalhada (o que vai ser possível através da espectroscopia de RMN no ponto que se segue), determinação rigorosa do teor de etanol (uma vez que a informação contida no rótulo das garrafas é apenas uma aproximação) e de açúcares redutores e estudo do grau de ramificação das dextrinas.

4.4 Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN

Na Figura 4.5 estão representados os espectros de RMN de 3 amostras de cerveja da mesma marca, uma de cada país, produzidas no mesmo mês. Como se pode ver, pela simples observação dos espectros não é possível encontrar variações que possam ser correlacionadas com o país de origem ou data de produção, devido não só ao elevado número de picos, bem como à grande complexidade de cada sinal.

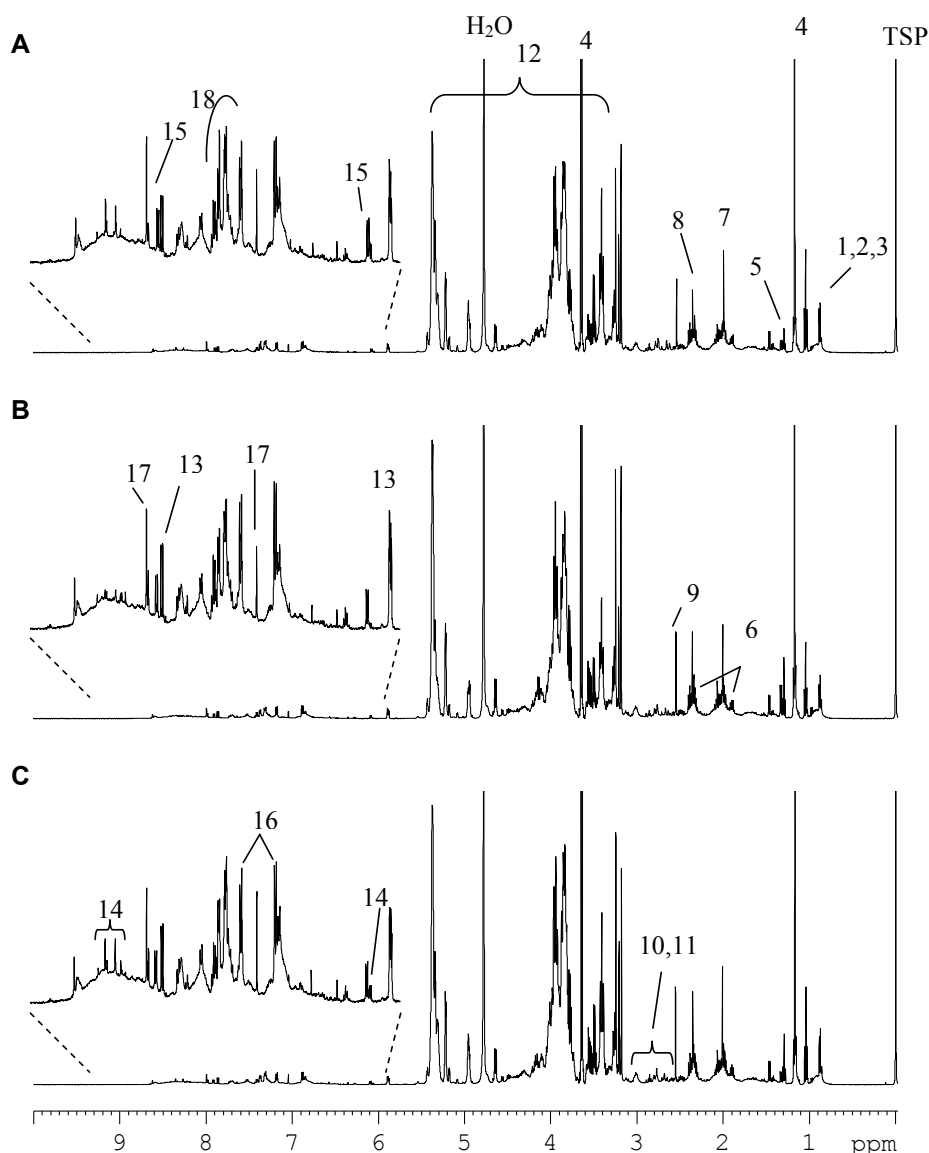


Figura 4.5 Espectros de RMN de ^1H de 3 cervejas da mesma marca, uma de cada país (1-propanol, 2-isobutanol, 3-isopentanol, 4-etanol, 5-lático, 6-prolina, 7-acético, 8-pirúvico, 9-succínico, 10-cítrico, 11-málico, 12-dextrinas, 13-uridina, 14-adenosina/inosina, 15-citidina, 16-tirosina/tirosol, 17-histidina, 18-fenilalanina).

Com o objectivo de procurar as principais características que definem os espectros RMN de ^1H das amostras de cerveja analisadas, realizou-se uma PCA usando, inicialmente, a região de 0,5-10,4 ppm, excluindo os sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,65 ppm). Os dois primeiros PCs (Figura 4.6) expressam 73% da variabilidade total, o que significa que uma grande parte dos factores responsáveis pela separação é explicada por estes PCs.

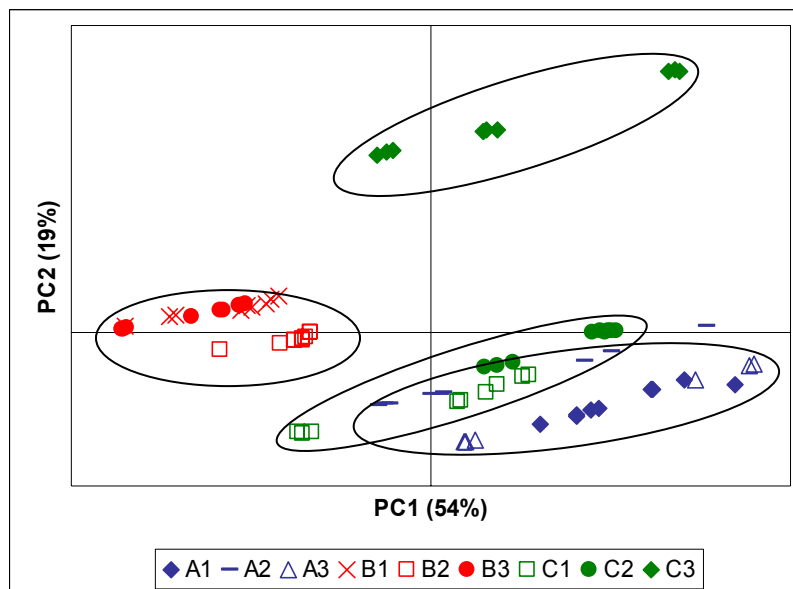


Figura 4.6 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 (LB 0,3 Hz).

Como se pode verificar, e à semelhança dos resultados obtidos por FT-IR, as cervejas do país B (vermelho) encontram-se agrupadas e separadas das restantes, caracterizando-se por valores de PC1 negativo e PC2 nulo. As cervejas C3 também se encontram agrupadas e distanciadas das restantes amostras, apresentando valores positivos de PC2. As restantes amostras encontram-se, principalmente, no quadrante com PC1 positivo e PC2 negativo, mostrando uma maior dispersão.

Para interpretar esta separação é necessário analisar o gráfico das contribuições factoriais de PC1 e PC2 (Figura 4.7). Como se pode ver, a análise é difícil devido, sobretudo, aos efeitos do tipo de primeira derivada provocados por artefactos, tais como, diferenças de pH, concentração e/ou instabilidade instrumental. Uma vez que as réplicas da mesma amostra são praticamente coincidentes, mostrando uma estabilidade instrumental e não são esperadas grandes diferenças na concentração dos compostos, o factor mais relevante para o aparecimento desses efeitos do tipo de primeira derivada parece ser o pH ($\Delta\text{pH}=0,33$), sendo necessário em estudos semelhantes futuros, garantir uma homogeneidade dos valores de pH, por exemplo, pela adição de um tampão (Lachenmeier *et al.*, 2005).

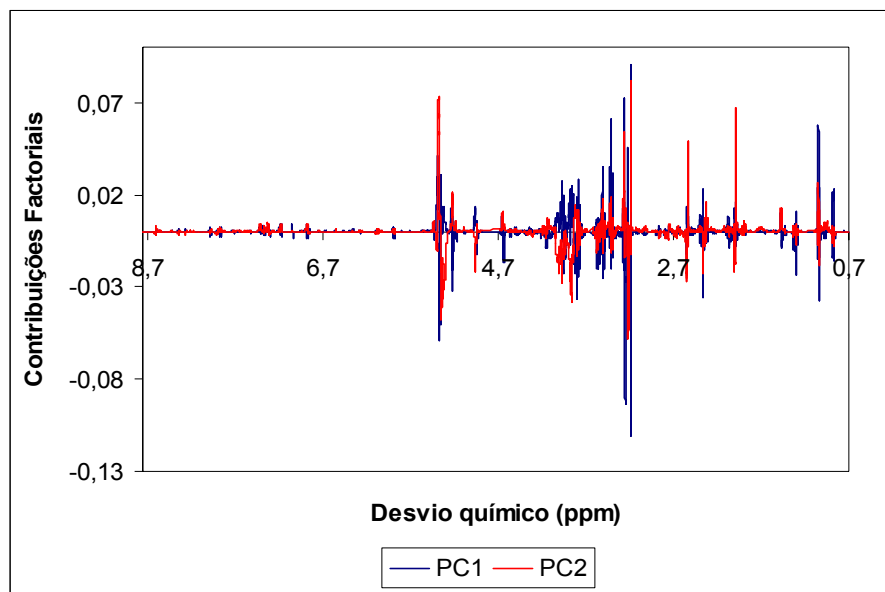


Figura 4.7 Contribuições factoriais de PC1 e PC2 (LB 0,3 Hz).

De forma a minimizar estes artefactos, os espectros de RMN foram processados com um factor de LB (*line-broadening*) superior (LB 10 Hz), ou seja o FID inicial foi multiplicado exponencialmente por um factor de 10. Este tratamento dos espectros torna-se vantajoso, principalmente para a análise multivariada, uma vez que, ao alargar os picos, reduz significativamente ou elimina os desvios, possibilitando a comparação entre os vários espectros e a detecção das similaridades/diferenças reais entre as várias amostras. No entanto, tem como contrapartida a diminuição da resolução espectral, o que provoca a perda de informação, principalmente nas regiões onde os picos são menos intensos e onde se encontram muito próximos uns dos outros (aromática e alifática), como se pode ver na Figura 4.8. A PCA foi aplicada à nova matriz obtida, usando espectros com LB 10 Hz, excluindo a região da água e etanol.

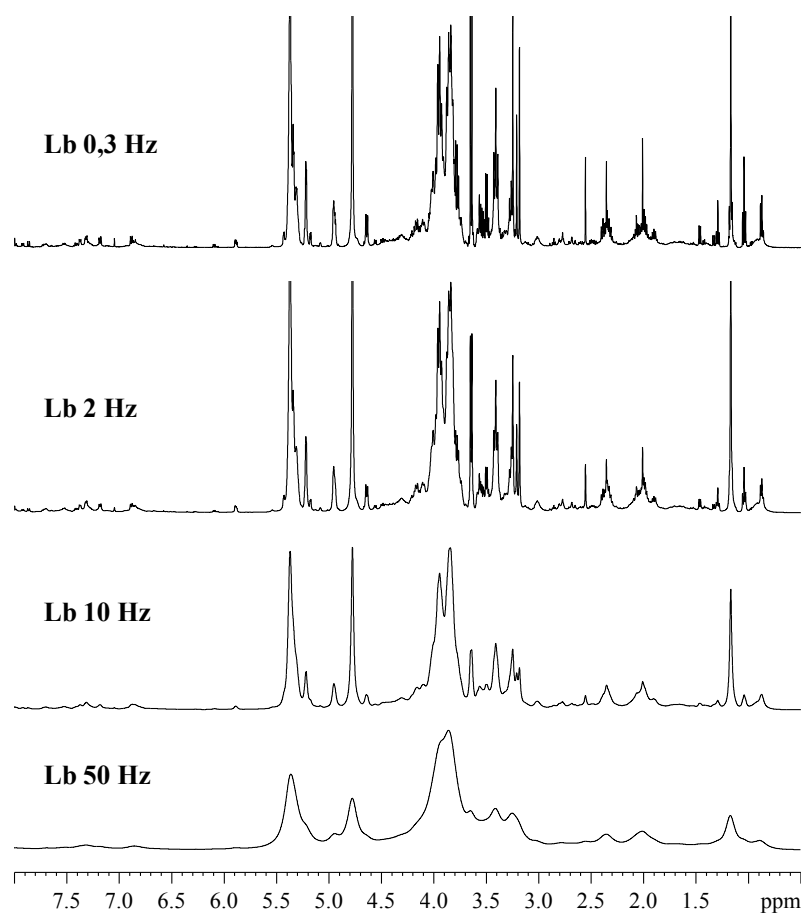


Figura 4.8 Espectros de RMN ^1H de cerveja, 500 MHz, processados com diferentes valores de LB.

A Figura 4.9 mostra as coordenadas factoriais dos dois primeiros PC's, que expressam 85% da variabilidade total. Como se pode ver, a disposição das amostras é muito semelhante à obtida com os espectros originais (LB 0,3 Hz), no entanto, os grupos aparecem mais agregados, uma vez que os pequenos desvios, devido às diferenças de pH, foram minimizados.

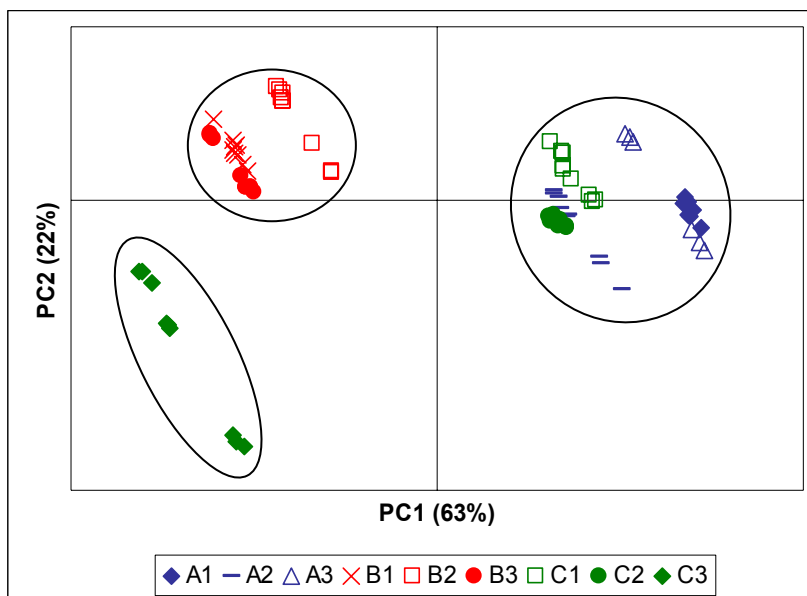


Figura 4.9 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2, dos espectros processados com LB 10 Hz.

Analisando as contribuições factoriais respectivas (Figura 4.10), podemos ver que os efeitos do tipo de primeira derivada são muito menores, mas devido ao elevado número de picos a interpretação continua difícil. Também a análise de toda a gama espectral não permite detectar as variações nos compostos minoritários, pois sobressaem as variações nos compostos mais intensos, e por este motivo, a PCA foi aplicada por regiões espectrais: alifática, açúcares e aromática.

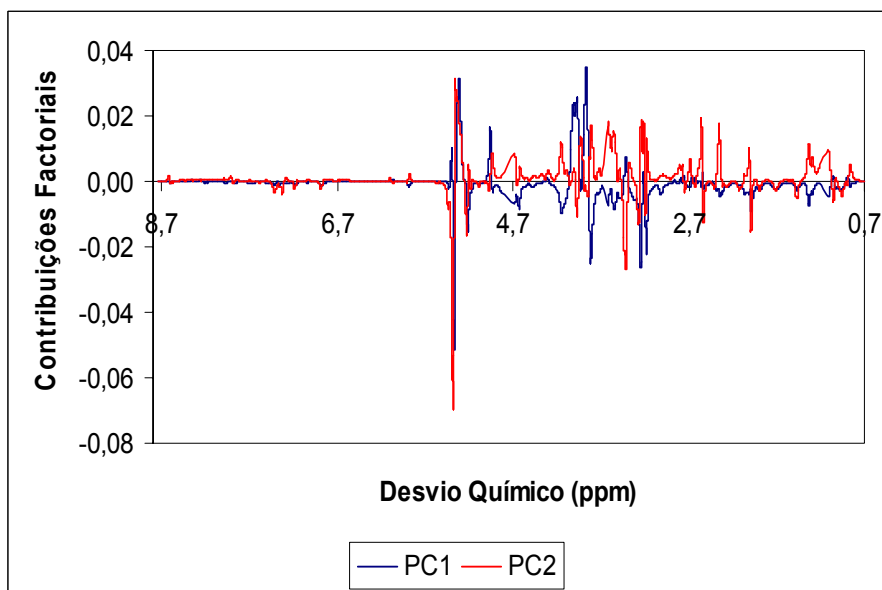


Figura 4.10 Contribuições factoriais (PC1 e PC2), dos espectros processados com LB 10 Hz.

Na região alifática a PCA foi aplicada de 3,1-0,5 ppm, excluindo o sinal do etanol (1,17 ppm). A Figura 4.11 refere-se ao mapa das coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da região alifática dos espectros de RMN de ^1H (LB 0,3 Hz). Como se pode ver, existe uma dispersão considerável das amostras, embora exista uma tendência para o agrupamento das cervejas produzidas no país A (a azul). No entanto, quando se compara os resultados da PCA nesta região, com os resultados da PCA aplicada ao espectro completo (Figura 4.6), observam-se claramente diferenças, mostrando a importância de avaliar as sub-regiões separadamente (análise mais fina), de modo a obter informação adicional e complementar. Para interpretar a separação das amostras no mapa das coordenadas factoriais, é necessário analisar o gráfico das respectivas contribuições factoriais (Figura 4.12). Como se pode ver, existe um elevado número de picos, assim como efeitos do tipo de primeira derivada, que indicam pequenos desvios químicos dos sinais, causados principalmente, como já foi mencionado, por pequenas diferenças do pH das amostras (Tabela 4.1), o que dificulta a sua interpretação. Deste modo, mais uma vez, foi efectuada uma PCA da região alifática, dos espectros com valores mais elevados de LB.

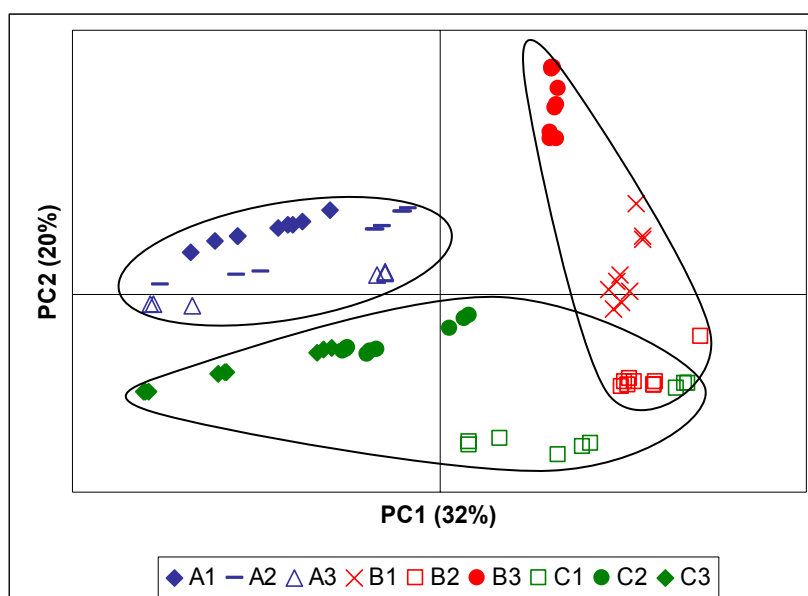


Figura 4.11 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da região alifática dos espectros ^1H de RMN (LB 0,3 Hz).

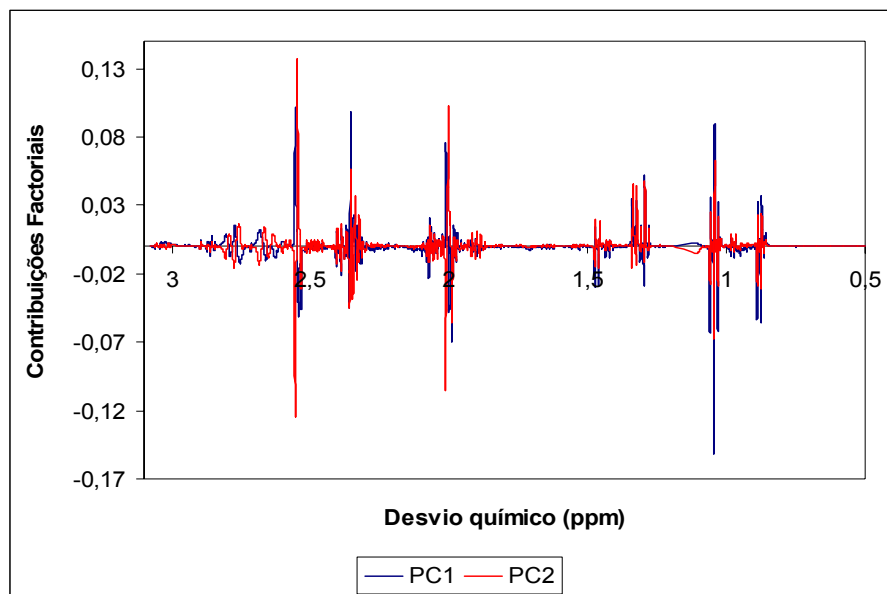


Figura 4.12 Contribuições factoriais (PC1 e PC2) da região alifática dos espectros de RMN de ^1H .

Na Figura 4.13 apresentam-se os mapas das coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da PCA quando aplicada à região alifática dos espectros processados com diferentes valores de LB (2, 5, 10, 30 e 50 Hz), excluindo o sinal do etanol. Como se pode verificar, com o aumento do valor de LB, parece existir uma tendência evolutiva para o agrupamento das amostras em função da sua origem. No entanto, para LB 30 e 50 Hz essa tendência não se mantém, verificando-se, novamente, uma grande dispersão das amostras. O valor de LB 10 Hz é aquele que, aparentemente, confere os melhores resultados em termos de separação das cervejas, por origem geográfica e também por data de fabrico. Também é de notar que não são visíveis diferenças entre as garrafas do mesmo lote de fabrico, denotando uma estabilidade instrumental e homogeneidade das amostras, nem sobreposições de amostras provenientes de países diferentes, como acontecia no caso dos espectros com LB 0,3 Hz. Sendo assim, a análise será focada nestes resultados.

Para tentar perceber as razões desta separação analisaram-se os mapas das contribuições factoriais de PC1 e PC2 resultantes da PCA da região alifática dos espectros de RMN processados com LB 10 Hz (Figura 4.14).

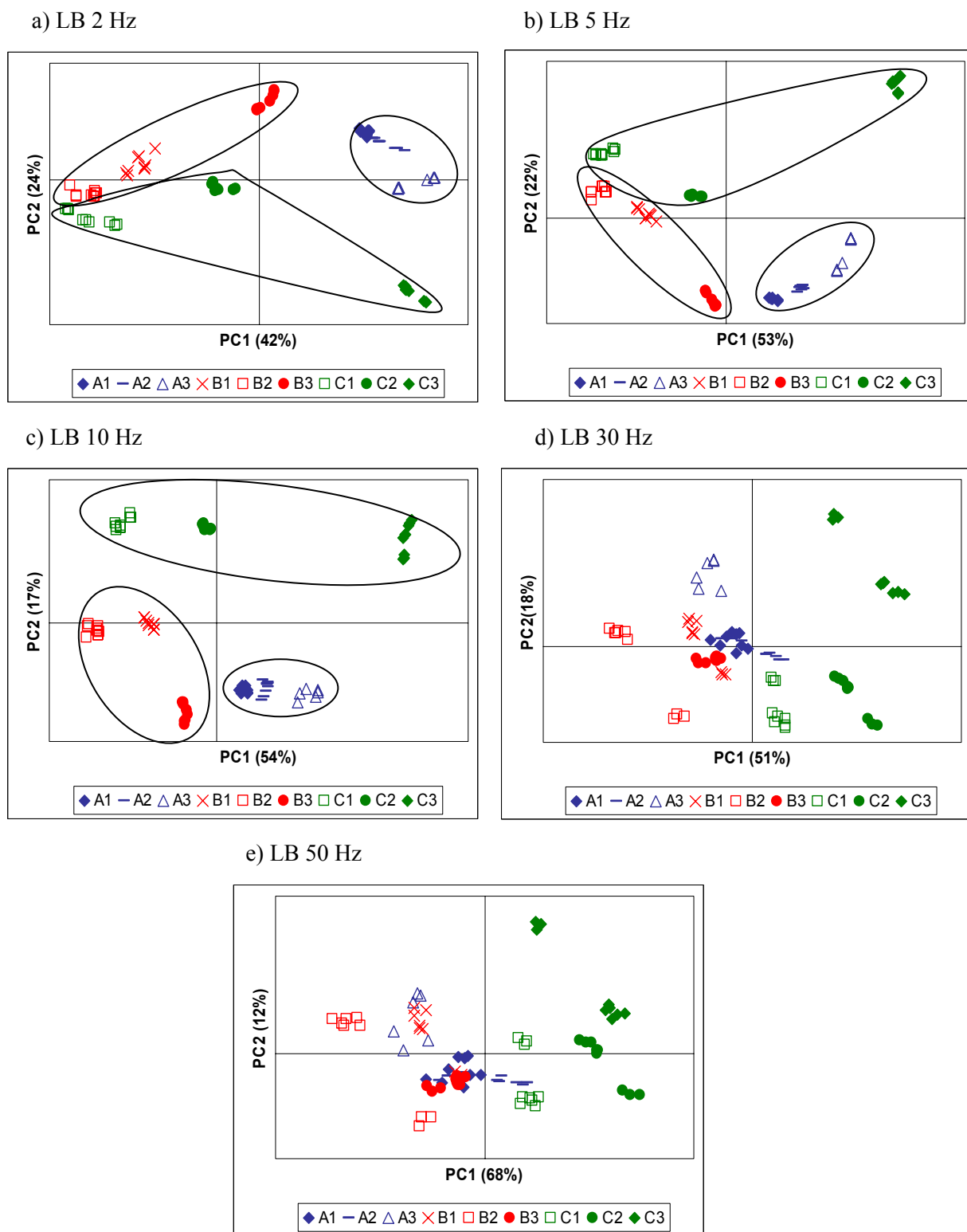


Figura 4.13 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da região alifática dos espectros de RMN de ^1H processados com diferentes LB's: a) 2, b) 5, c) 10, d) 30 e e) 50 Hz.

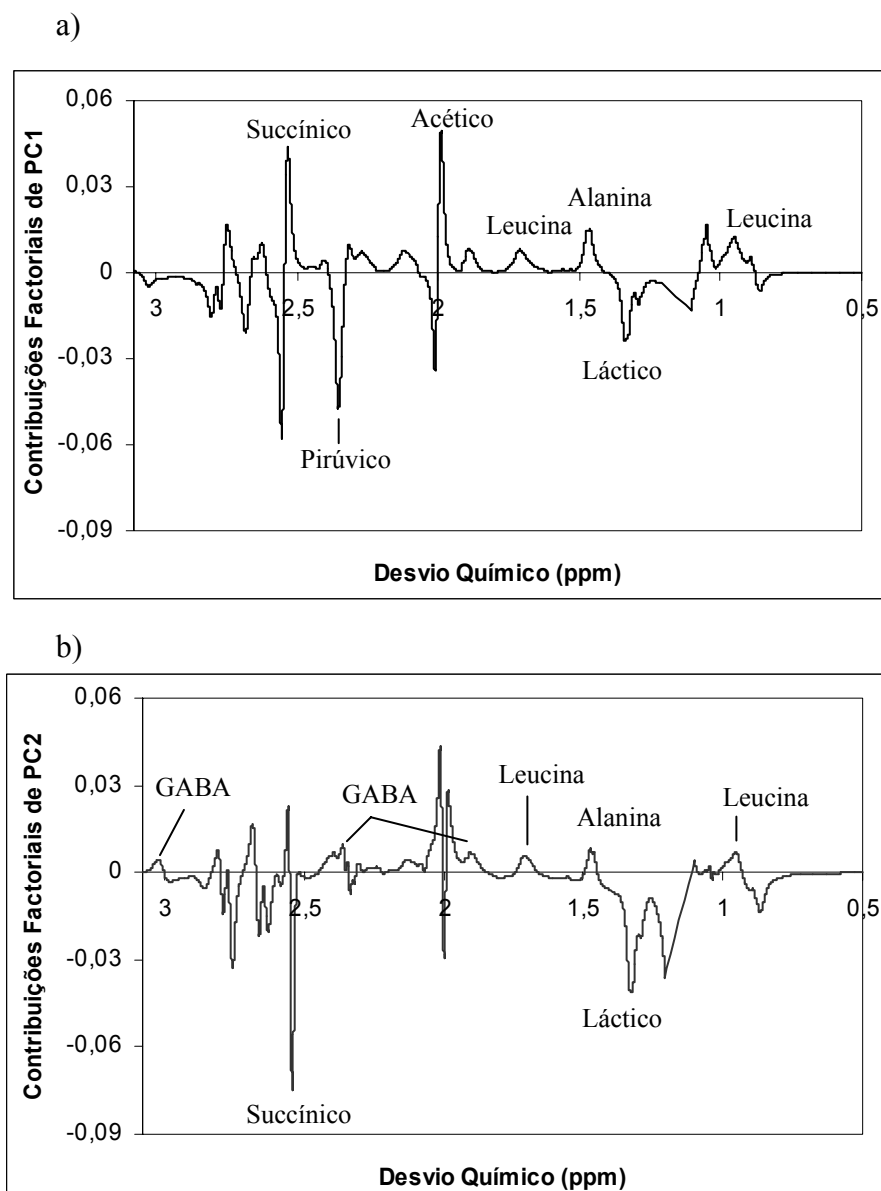


Figura 4.14 Contribuições factoriais de a) PC1 b) PC2 (LB 10 Hz).

As amostras produzidas no país A (a azul) podem ser distinguidas das amostras do país B (a vermelho) ao longo do eixo de PC1, uma vez que apresentam valores opostos neste eixo. Assim, pela inspecção do gráfico das contribuições factoriais de PC1 (Figura 4.14a) podemos sugerir que as amostras do país A (PC1 positivo) apresentam teores mais elevados de leucina e alanina, ao contrário das amostras situadas na parte negativa do eixo de PC1 (cervejas do país B). Estas, por sua vez, apresentam concentrações maiores de ácido láctico e pirúvico, como se pode ver na Figura 4.15. O ácido pirúvico é um produto intermediário da biossíntese do etanol pela levedura e é sabido, que cervejas com níveis

elevados de piruvato, possam ter sido produzidas com leveduras que sofrem autólise (destruição da célula depois da sua morte) durante a fermentação. É possível, portanto, que esse conteúdo mais alto de ácido pirúvico e o seu produto de redução, o ácido láctico, possam ser indicativos da qualidade mais pobre da levedura ou da acção de gerações mais velhas.

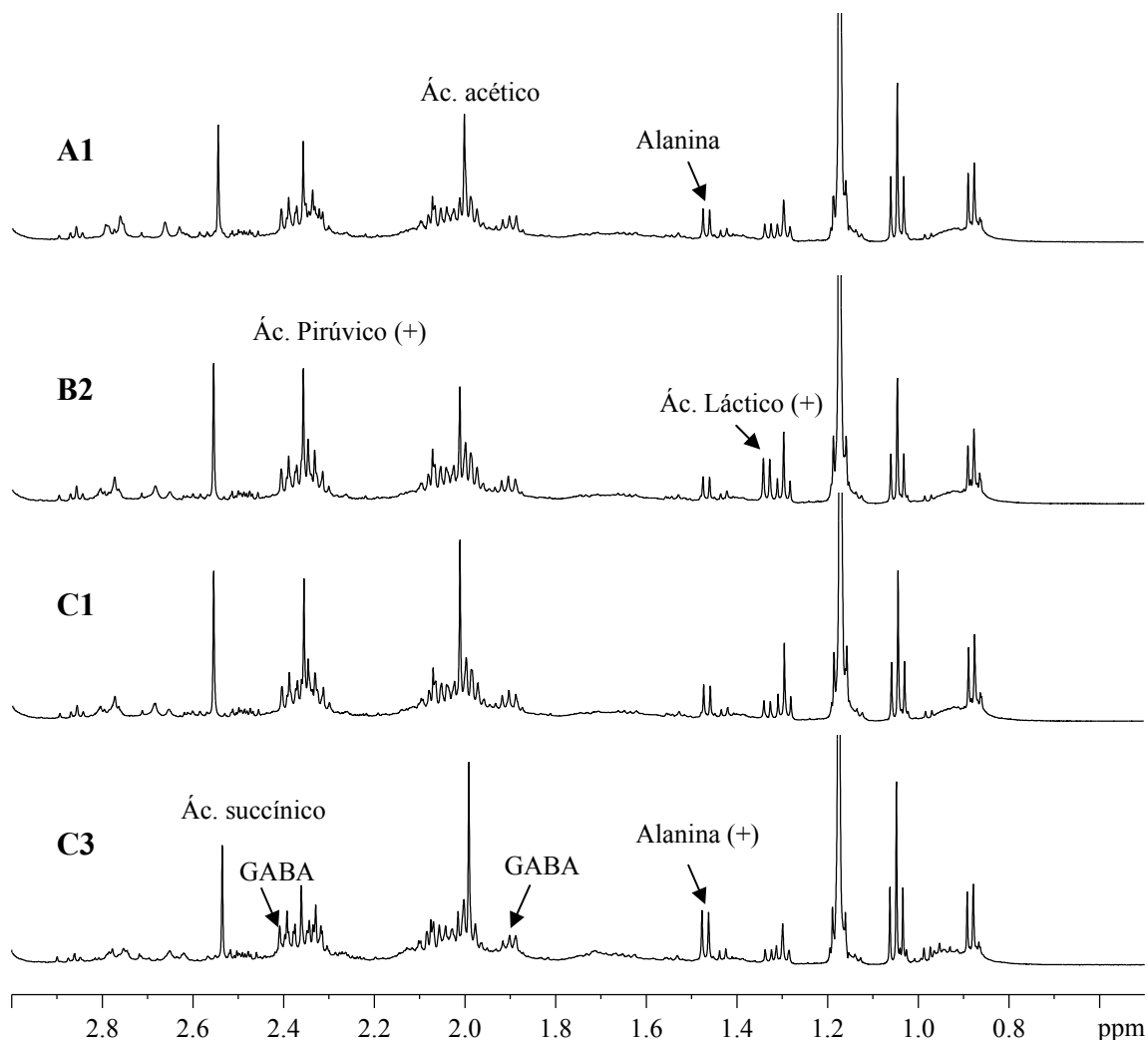


Figura 4.15 Região alifática dos espectros de RMN ^1H de 4 cervejas diferentes, identificadas segundo a Tabela 4.1.

Em relação às amostras do país C, localizadas na parte positiva do eixo de PC2, pela análise do gráfico das contribuições factoriais deste eixo (Figura 4.14b) pode-se sugerir que estas contêm maiores teores de leucina, alanina e GABA e menores teores de ácido láctico e succínico. Parte destas afirmações, e uma vez que não foi possível quantificar o teor dos aminoácidos referidos, devido à sobreposição de sinais, podem ser confirmadas pela

observação da Tabela 4.2. Nesta tabela encontram-se as quantidades estimadas nas amostras de cerveja, dos 3 ácidos orgânicos mencionados (lático, pirúvico e succínico). As concentrações foram obtidas por integração do sinal relativamente à área do TSP (referência de intensidade). O sinal do TSP surge a 0,0 ppm e conta com a contribuição de 9 prótons (3 grupos metilo). O valor da área do sinal, medido em todos os espectros, reflecte a concentração adicionada (0,02 %) a cada amostra. A concentração desconhecida do composto Y, presente na cerveja, pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$C_Y = F (A_Y \cdot M_Y / n_Y) (C_{TSP} \cdot n_{TSP} / M_{TSP})$$

Onde, C é a concentração, F o factor de diluição, A a área do sinal integrado, M a massa molecular e n o número de prótons que contribuem para o sinal integrado (Duarte *et al.*, 2003).

Para cada país de origem, e a partir dos espectros, determinaram-se as concentrações nas 9 amostras e calculou-se a média, com excepção das amostras produzidas no país C, onde se verificou uma grande dispersão entre as datas de fabrico, podendo mesmo serem divididas em 2 grupos: o grupo das amostras produzidas nas datas 1 e 2 (Fevereiro e Março de 2002), com PC1 negativo, e o grupo das amostras C3, com PC1 positivo. Como se pode ver no gráfico das contribuições factoriais e confirmado pela observação dos espectros e da tabela seguinte, as amostras C1 e C2 apresentam teores mais elevados de ácido pirúvico e lático do que as amostras C3. Isto é também consistente com os valores de pH, relativamente mais elevados, das cervejas C3. Estes resultados sugerem que as variações dentro de um local de produção podem reflectir a qualidade variável da levedura ao longo do tempo ou, alternativamente, dado que a maioria dos fabricantes de cerveja substituem periodicamente a cultura da levedura, que a que foi usada para produzir as cervejas C3 poderia ser mais nova, em termos do número de gerações, do que a usada para produzir C1 ou C2.

Tabela 4.2 Concentração de alguns ácidos orgânicos, consoante o país de origem da cerveja.

Composto	Concentração (mg/L)			
	País A	País B	País C (C1+C2)	País C (C3)
Ácido Láctico (1,34 ppm)	28,9 ± 3,0	68,9 ± 6,6	28,1 ± 2,1	25,1
Ácido Pirúvico (2,35 ppm)	71,6 ± 8,6	100,0 ± 4,4	93,1 ± 14,2	63,4
Ácido Succínico (2,54 ppm)	64,2 ± 3,2	78,6 ± 8,6	70,5 ± 8,4	64,6

Na região dos açúcares a PCA foi aplicada de 5,8-3,1 ppm, excluindo os sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (3,64 ppm). Na Figura 4.16 podemos ver o gráfico das coordenadas factoriais PC1 vs. PC2, que conjuntamente explicam 83% da variabilidade total. As cervejas do país B, localizadas na parte negativa do eixo de PC1, estão claramente separadas das restantes. As cervejas produzidas nos países A e C estão agrupadas mas mostrando grande dispersão ao longo do eixo de PC1, com excepção das amostras C3 (Abril de 2002), que se encontram na parte positiva do eixo PC2.

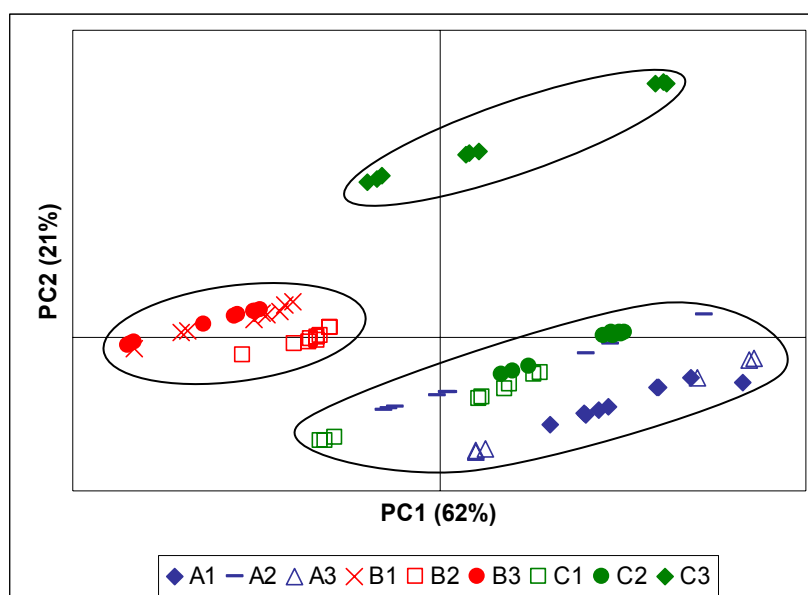


Figura 4.16 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da região dos açúcares dos espectros ^1H de RMN (LB 0,3 Hz).

Como se pode ver na Figura 4.17 a análise das contribuições factoriais de PC1 e PC2 é muito complicada, devido aos efeitos do tipo de primeira derivada, e por isso, os espectros foram processados com valores mais elevados de LB, que em seguida foram analisados por PCA.

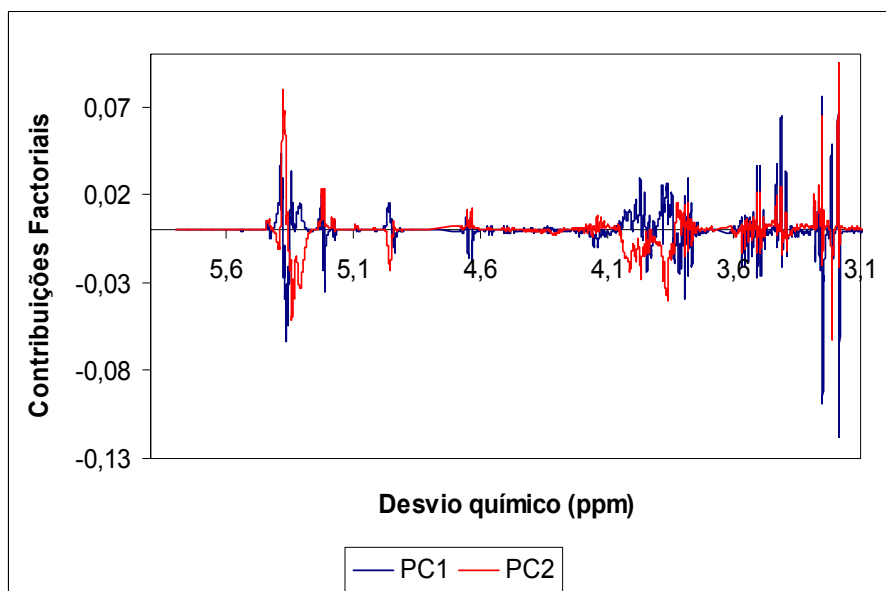
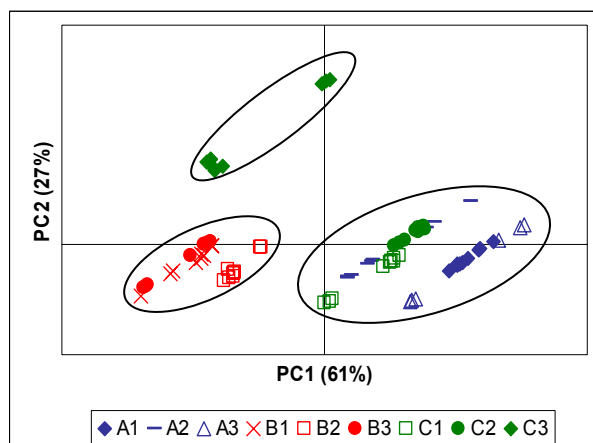


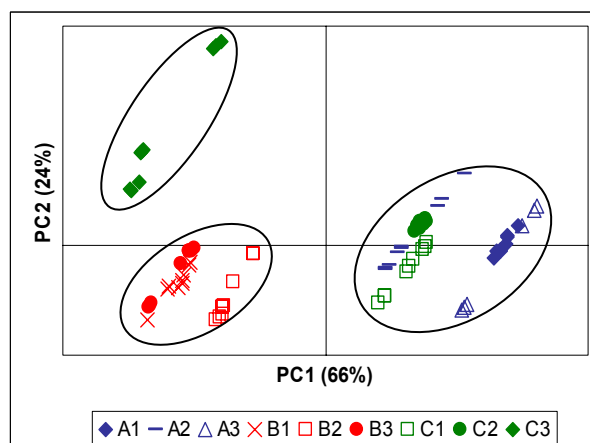
Figura 4.17 Contribuições factoriais (PC1 e PC2) da região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H (LB 0,3 Hz).

Na Figura 4.18 pode-se verificar que a distribuição das amostras no mapa das coordenadas factoriais é semelhante para os vários LB's (2, 5, 10 e 30 Hz), embora com LB 10 Hz os grupos sejam mais uniformes e, como foi visto anteriormente, a análise das contribuições factoriais é mais facilitada, pois os efeitos do tipo de primeira derivada são menos significativos. Assim, tal como foi feito na região alifática, os resultados da PCA aplicada aos espectros processados com LB 10 Hz, foram analisados com mais pormenor.

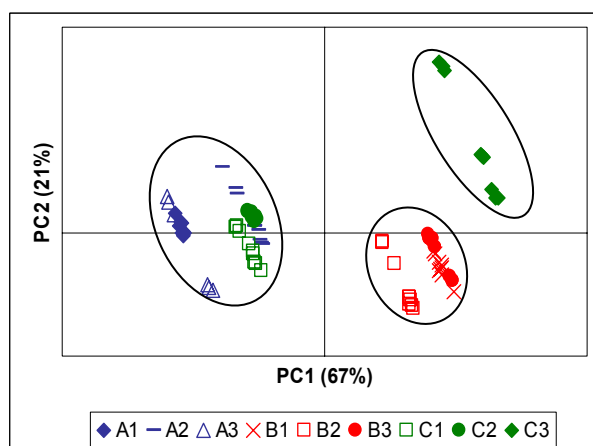
a) LB 2 Hz



b) LB 5 Hz



c) LB 10 Hz



d) LB 30 Hz

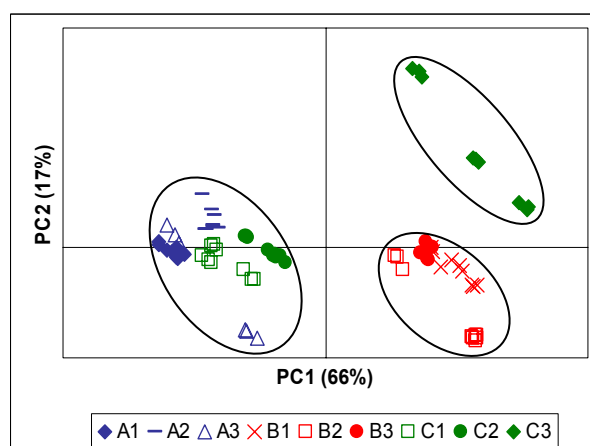


Figura 4.18 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H processados com diferentes LB's: a) 2, b) 5, c) 10 e d) 30 Hz.

Analisando as contribuições factoriais de PC1 e PC2 (Figura 4.19), resultantes da aplicação da PCA aos espectros processados com LB 10 Hz, muito mais simplificadas que as obtidas a partir da PCA dos espectros com LB 0,3 Hz (Figura 4.17), podemos retirar alguma informação em termos de picos responsáveis pela separação das amostras. No entanto, como se sabe, nesta região não é fácil identificar os compostos, devido à forte sobreposição de picos e por isso, a análise será focada na região onde aparecem os picos anoméricos dos açúcares (4,6 – 5,6 ppm).

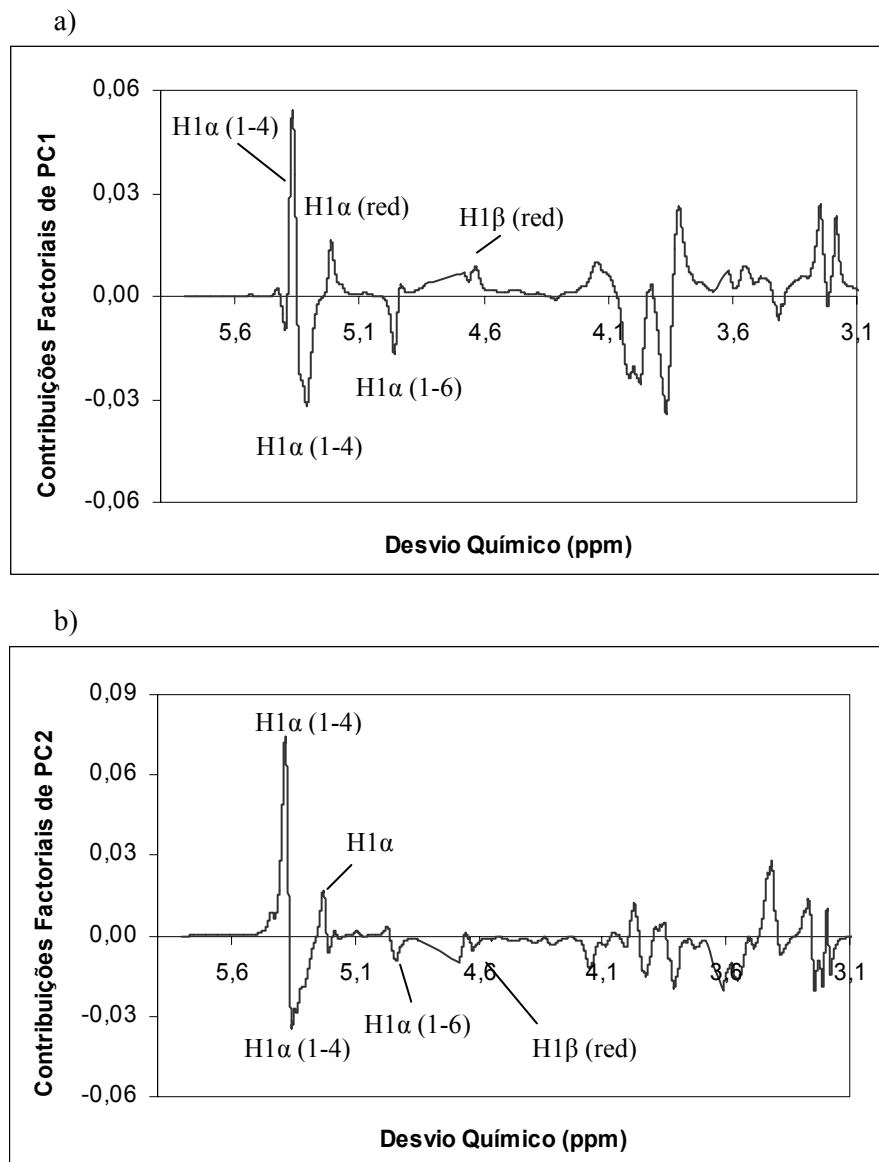


Figura 4.19 Contribuições factoriais de a) PC1 e b) PC2 (região dos açúcares – LB 10 Hz).

A análise da Figura 4.19 revela que as cervejas que se encontram na parte negativa do eixo de PC1 (Figura 4.18c), produzidas nos países A e C, com excepção das C3, são caracterizadas pelos sinais a 4,96 (H1 α , 1→6) e a 5,3-5,4 (H1 α , 1→4) ppm, característicos das dextrinas ramificadas, sugerindo que estas amostras contêm teores mais elevados deste tipo de açúcares. Por sua vez, as amostras C3 situam-se no quadrante com PC1 e PC2 positivos. Observando o gráfico das contribuições factoriais de PC1 e PC2, pode-se verificar que os valores positivos são devidos aos sinais a 4,63 (H1 β red), 5,21 (H1 α red) e 5,37 (H1 α , 1→4) ppm, característicos de dextrinas lineares. Finalmente, as cervejas do país

B apresentam valores positivos de PC1 e valores negativos de PC2. Como já foi referido, os valores positivos de PC1 são devidos aos sinais localizados a 4,63, 5,21 e 5,37 ppm, característicos de dextrinas lineares. No entanto, no gráfico das contribuições factoriais de PC2, encontram-se valores negativos a 4,94 (H1 α , 1 \rightarrow 6) e a 5,30-5,35 (H1 α , 1 \rightarrow 4) ppm, característicos de dextrinas ramificadas. Estes resultados podem parecer contraditórios, mas indicam que as dextrinas das cervejas do país B têm um grau de ramificação intermédio, comparando com as restantes. Na Figura 4.20 estão apresentadas as regiões dos açúcares de 3 espectros, um de cada país de origem. Como se pode ver, o espectro do país A é aquele que apresenta um sinal mais largo a 5,3-5,4 ppm, característico de dextrinas ramificadas, enquanto que o espectro das cervejas C3 apresenta um pico mais estreito, característico de dextrinas lineares.

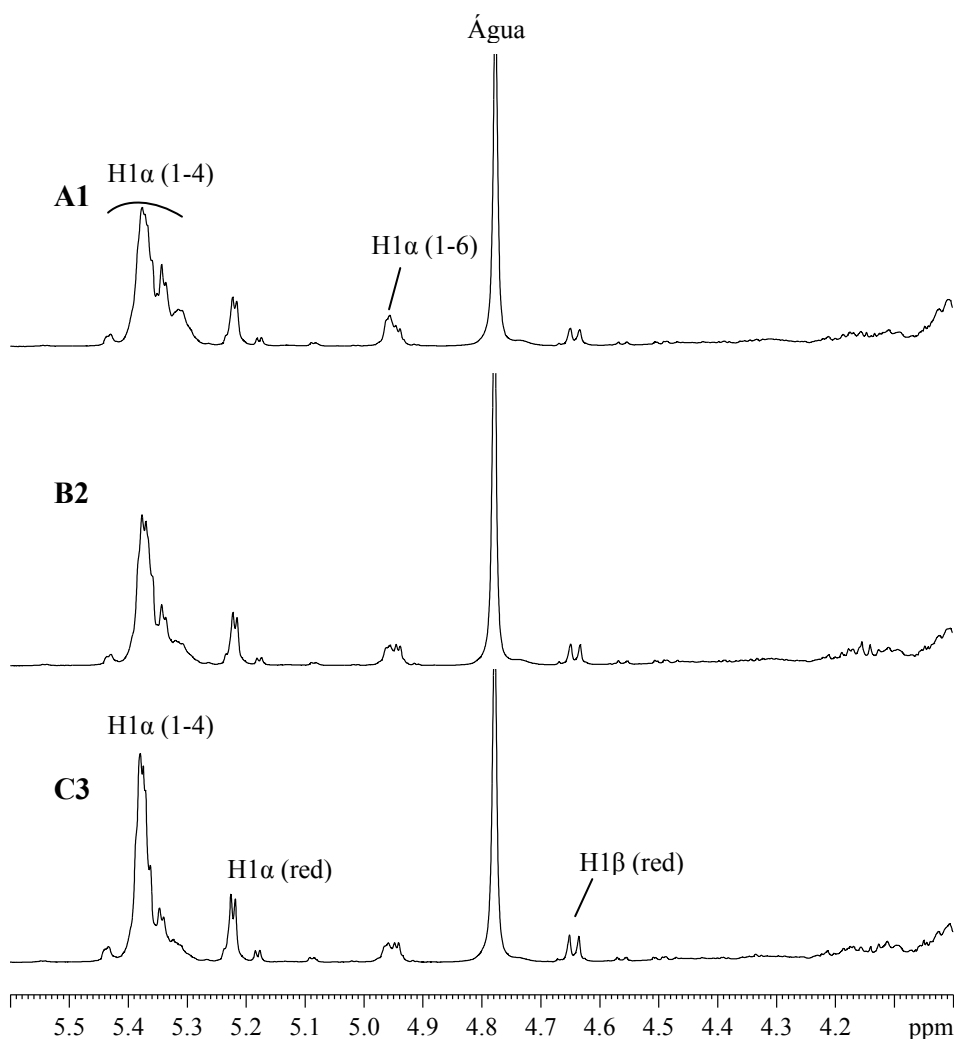


Figura 4.20 Região dos açúcares dos espectros de RMN de ¹H de 3 cervejas, identificadas segundo a Tabela 4.1.

Para confirmar estes resultados, foi necessário fazer uma análise mais detalhada dos espectros de RMN de ^1H , integrar os picos relevantes e a partir desses valores calcular o número médio de anéis de glucose e de pontos de ramificação por molécula (Duarte *et al.* 2003). O número médio de anéis de glucose por molécula é obtido através da razão das áreas dos sinais dos protões H1 nas posições $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$, cujos sinais aparecem a 5,30-5,40 e 4,9-5,0 ppm, respectivamente, e das áreas dos protões redutores H1 (5,22 e 4,63 ppm para os anómeros α e β , respectivamente). O número médio de pontos de ramificação por molécula é estimado através da razão entre o integral do pico dos protões H1 na posição $\alpha(1-6)$ (sinal a 4,9-5,0 ppm) e o integral dos picos H1 na posição $\alpha(1-4)$, cujos sinais aparecem a 5,3-5,4 ppm, multiplicada pelo número total de ligações. Os resultados (Tabela 4.3) mostram que as cervejas do país A e as C1 e C2 contêm dextrinas com um maior número de pontos de ramificação, enquanto que as C3 são aquelas que têm um menor número. Com um grau intermédio de ramificação temos as cervejas do país B, confirmando-se, assim, os resultados obtidos na PCA. Uma explicação possível para estas diferenças no grau de ramificação é baseada na actividade das enzimas α e β -amilases, envolvidas no processo de fabrico da cerveja. A α -amilase é uma endo-enzima com uma resistência térmica elevada e, por isso, sob determinadas condições térmicas pode ter actuado por mais tempo que a β -amilase, promovendo a presença de segmentos menos ramificados de dextrinas. Este parece ser o caso das cervejas produzidas no país B, em contraste com as dos países A e C (C1 e C2). Além disso, parecem existir variações significativas no processamento no país C, o que conduz às diferenças no grau de ramificação entre as várias datas de produção. Assim, as cervejas C3 são aquelas que apresentam um grau de ramificação menor, sugerindo, a presença de quantidades significativas de açúcares mais simples, como é o caso da glucose, trealose e/ou maltose. Estes açúcares podem ter permanecido na cerveja devido ao facto da fermentação não ter sido completa, o que pode ter sido causado por um arrefecimento precoce ou uma floculação das leveduras (Hughes e Baxter, 2001).

Tabela 4.3 Resultados dos cálculos do tamanho médio e pontos de ramificação das dextrinas.

Amostra	Nº médio de moléculas de glucose/molécula	Nº médio de ramificações/molécula
A	5,8	0,57
B	5,0	0,43
C1 e C2	5,8	0,54
C3	4,5	0,35

Com o objectivo de tentar maximizar também a contribuição dos compostos minoritários identificados na região aromática (10,4-5,8 ppm), realizou-se a PCA desta região dos espectros de RMN de ^1H processados com LB 0,3 Hz. Como se pode ver na Figura 4.21, a separação das amostras, segundo a sua origem geográfica, não é muito clara. Mais uma vez, esta dispersão pode ter a ver com as variações de pH das amostras, que causam pequenas alterações nos desvios químicos, fazendo aparecer efeitos do tipo de primeira derivada nos gráficos das contribuições factoriais de PC1 e PC2 (não apresentados).

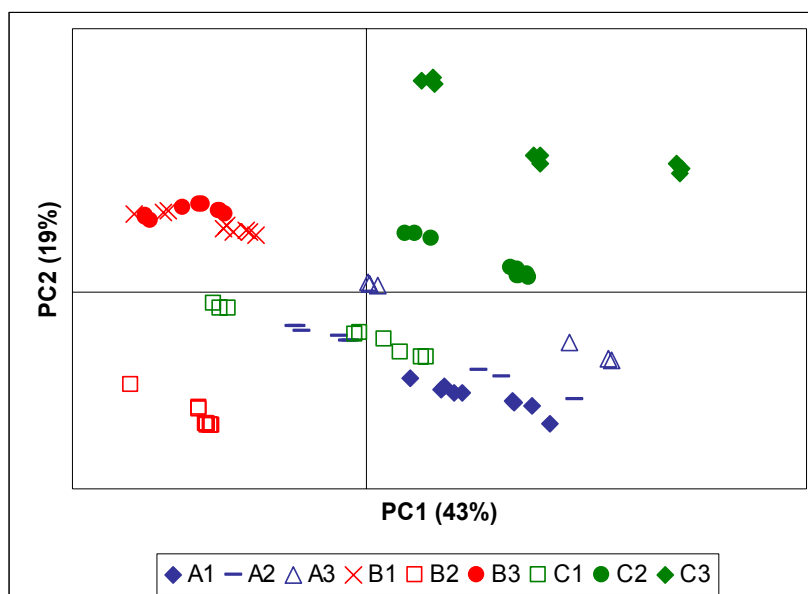


Figura 4.21 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da região aromática dos espectros ^1H de RMN (LB 0,3 Hz).

Tal como foi feito nas regiões anteriores, para tentar eliminar os efeitos dos desvios, processaram-se os espectros com diferentes valores de LB (2, 5, 10, 30 e 50 Hz). Como se pode ver na Figura 4.22, com o aumento do valor de LB, as amostras têm tendência a

agrupar-se consoante a sua origem geográfica. No entanto, com LB 50 Hz, os resultados não são tão satisfatórios, não sendo possível retirar qualquer tipo de informação relevante acerca das amostras.

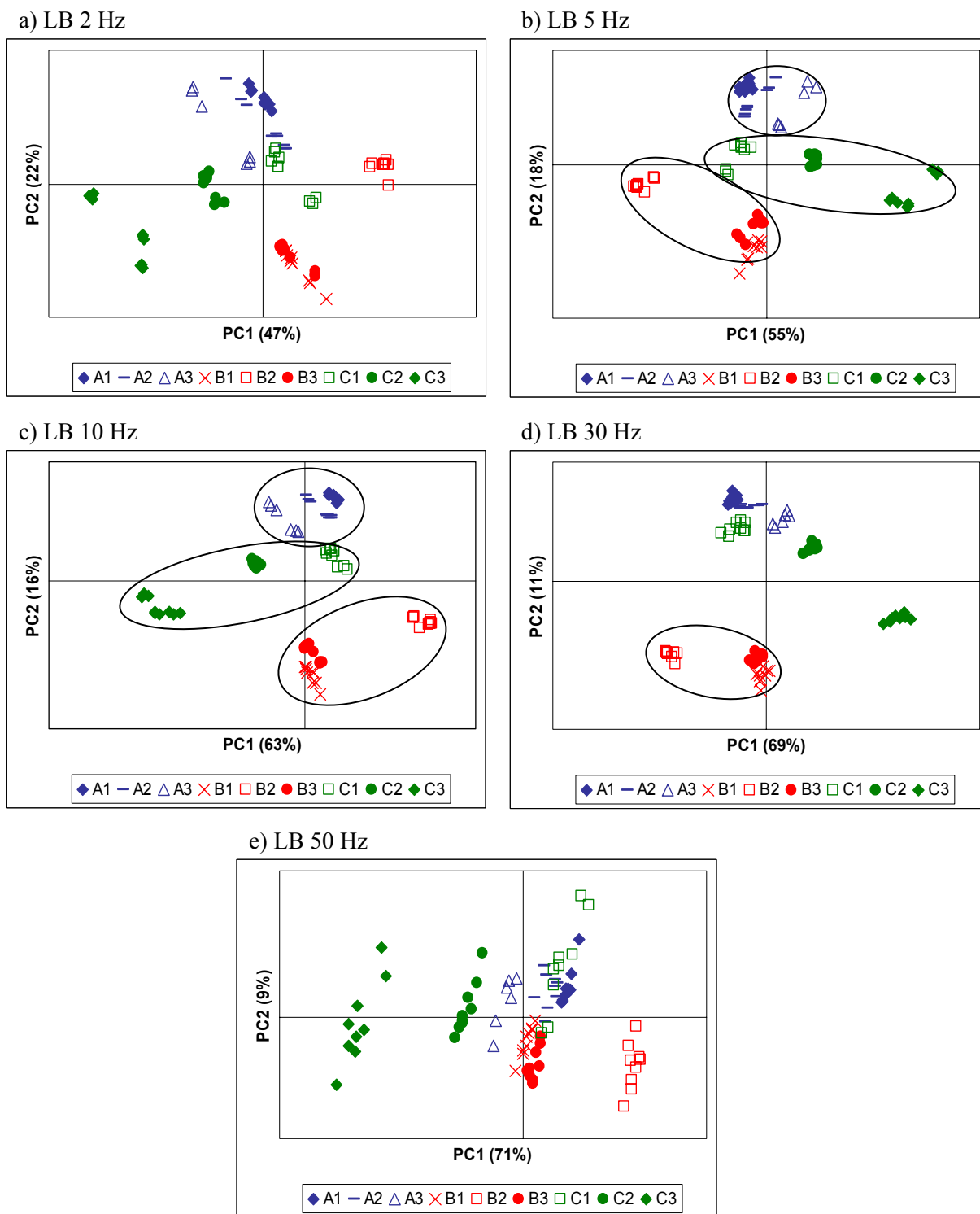


Figura 4.22 Coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 da região aromática dos espectros de RMN de ^1H processados com diferentes LB's: a) 2, b) 5, c) 10, d) 30 e e) 50 Hz.

Apesar da disposição das amostras ser muito semelhante para os LBs 5, 10 e 30 Hz, nota-se uma ligeira melhoria quando a PCA é aplicada aos espectros com LB 10 Hz e, por este motivo, a análise destes resultados foi feita em mais pormenor. Outro factor preponderante nesta escolha é o facto do gráfico das contribuições factoriais desta PCA ser mais fácil de analisar, ainda sem significativas perdas de informação espectral.

Analisando as contribuições factoriais de PC1 e PC2 (Figura 4.23), podemos verificar que as amostras do país A (PC2 positivo) são mais ricas em adenosina e/ou inosina (6,07, 8,26 e 8,35 ppm) e 2-feniletanol (7,32 e 7,38 ppm) e contêm teores mais baixos de uridina (5,88 e 7,85 ppm), tirosina e/ou tirosol (6,88 e 7,17 ppm) e histidina (7,04 e 7,98 ppm), em comparação com as cervejas produzidas no país B (PC2 negativo). Em relação às cervejas do país B, nota-se uma ligeira variação em termos de datas de fabrico. Assim, as amostras B2 estão na parte positiva do eixo de PC1 e distinguem-se das restantes por terem um teor mais elevado de polifenóis. Finalmente, as cervejas do país C aparecem separadas consoante a sua data de fabrico, ao longo do eixo de PC1. Este eixo sugere, principalmente, variações nas quantidades de 2-feniletanol (7,32 e 7,38 ppm), tirosina e/ou tirosol e histidina (7,04 e 7,98 ppm). As amostras C3 (PC1 negativo) diferem das restantes do país C por serem mais ricas em 2-feniletanol e tirosina e/ou tirosol. A presença de tirosol e 2-feniletanol na cerveja final pode ser devida à degradação dos aminoácidos. Durante o processo de fabrico da cerveja, certos aminoácidos são submetidos à degradação de Strecker e dão origem a aldeídos que, durante a fermentação, podem, enzimaticamente, ser reduzidos aos seus álcoois correspondentes (Hughes e Baxter, 2001).

Estas observações podem ser confirmadas através da análise da Tabela 4.4, onde se encontram as concentrações estimadas de alguns compostos que apresentam picos na região aromática.

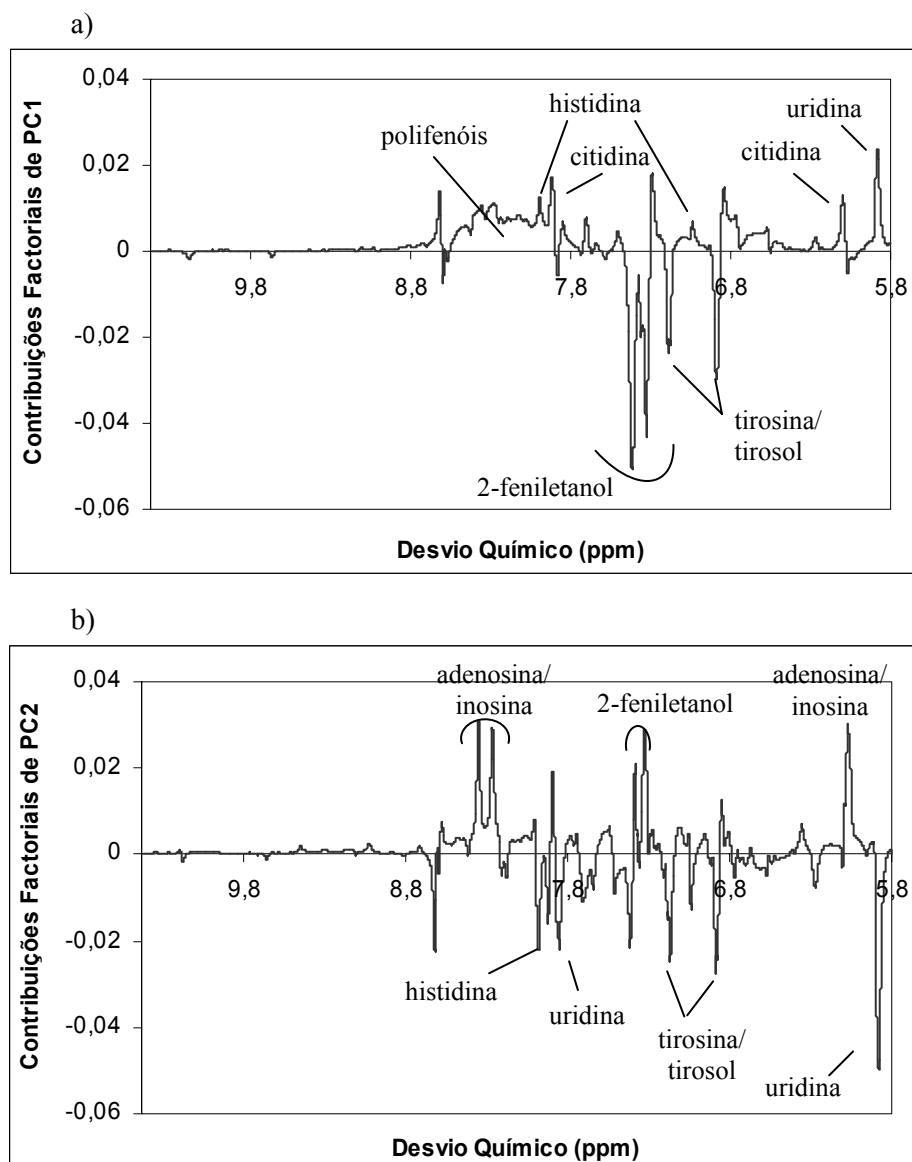


Figura 4.23 Contribuições factoriais de a) PC1 e b) PC2 (região aromática – LB 10 Hz).

As concentrações dos vários compostos, presentes na tabela, foram obtidas por integração do sinal respectivo, relativamente à área do TSP (Duarte *et al.*, 2003). Tal como foi feito na região alifática, para cada país de origem, e a partir dos espectros, determinaram-se as concentrações nas 9 amostras e calculou-se a média, com excepção das amostras C3, que denotam demasiadas diferenças em relação às outras amostras do país C.

Como se pode ver, as amostras do país C apresentam teores mais elevados de citidina e uridina, a amostras C1 e C2 contêm os teores mais altos de adenosina/inosina enquanto que as amostras C3 são mais ricas em 2-feniletanol, histidina e tirosina/tirosol.

Tabela 4.4 Concentração de alguns compostos, consoante o país de origem da cerveja.

Composto	Concentração (mg/L)			
	País A	País B	País C (C1+C2)	País C (C3)
Adenosina e/ou Inosina (8,35 ppm)	68,1 ± 8,9	49,2 ± 2,7	78,6 ± 4,3	48,4
Citidina (7,89 ppm)	101,5 ± 19,7	125,9 ± 9,3	119,2 ± 13,8	91,2
2-Feniletanol (7,30 ppm)	113,2 ± 9,2	122,2 ± 3,3	125,8 ± 13,6	132,8
Histidina (7,04 ppm)	44,3 ± 9,0	53,1 ± 4,3	50,7 ± 2,4	54,1
Tirosina/Tirosol (6,85/6,88 ppm)	96/127	107/140	108/142	126/166
Uridina (7,86 ppm)	106,7 ± 20,3	142,8 ± 11,7	127,9 ± 14,0	132,4

Na Figura 4.24 estão apresentadas as regiões aromáticas dos espectros de RMN de cervejas, dos vários países de origem. Nesta região aparecem sinais de vários compostos, muitos dos quais sobrepostos, o que dificulta a sua interpretação e daí a necessidade da PCA. Como se pode ver, as amostras do país A são mais ricas em adenosina/inosina e 2-feniletanol, enquanto que as amostras do país B contêm teores mais elevados de uridina e tirosina/tirosol. Quanto às amostras do país C, nota-se claramente diferenças no perfil aromático consoante a data de fabrico, principalmente na zona 7,3-7,5 ppm (fenilalanina e 2-feniletanol) e 8,1-8,4 ppm, onde se encontram sinais de adenosina/inosina e alguns compostos não identificados.

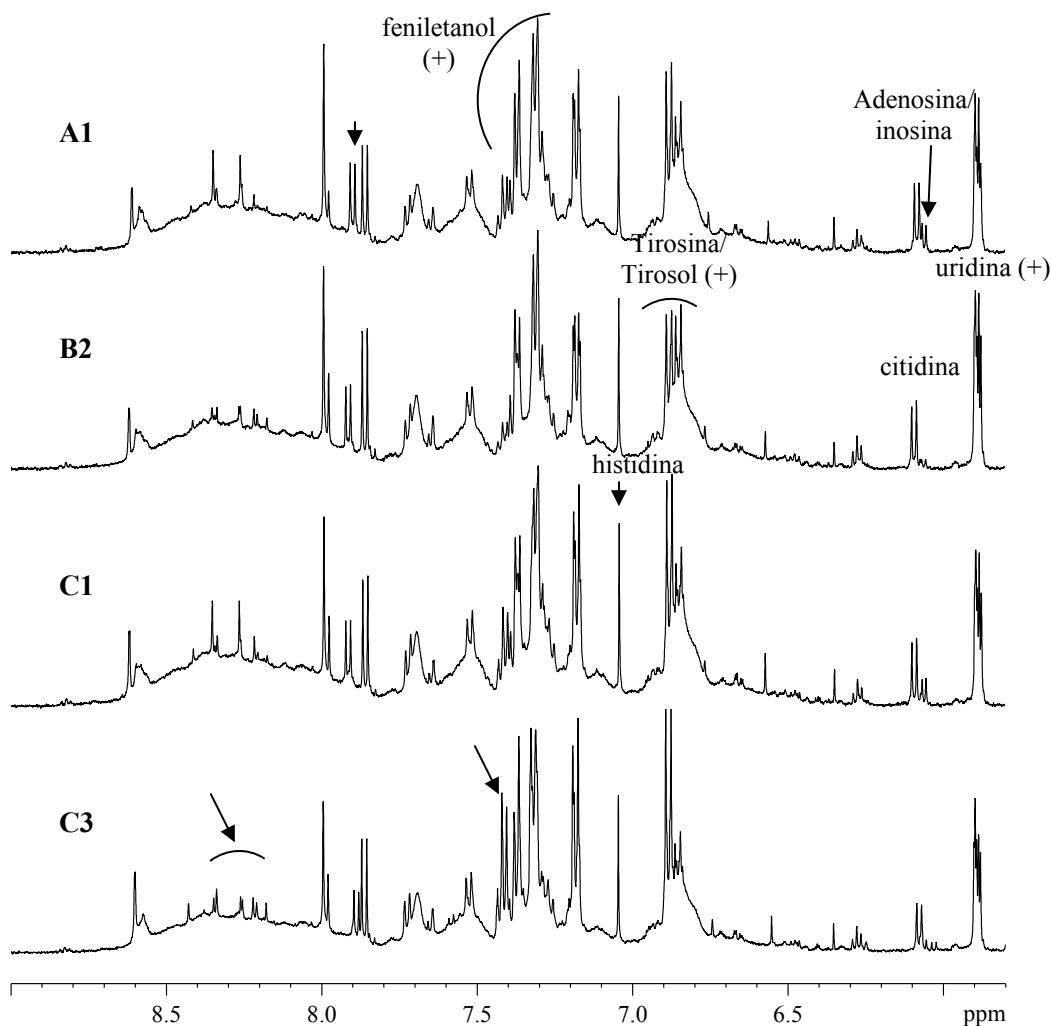


Figura 4.24 Região aromática dos espectros de RMN de ^1H de 4 cervejas, identificadas segundo a Tabela 4.1

4.5 Conclusões

A análise da região da impressão digital dos espectros de FT-IR permitiu a detecção dos compostos maioritários da cerveja, nomeadamente açúcares e etanol. Deste modo, a Análise em Componentes Principais dos espectros mostraram, apenas, pequenas variações nestes compostos. Foi constatado que as cervejas produzidas no país B apresentavam teores mais elevados de etanol enquanto que as cervejas do país A, produzidas na data 3, apresentavam teores mais elevados de maltose e dextrinas. Estes resultados são promissores, mas seria necessário um estudo mais aprofundado afim de se poder

caracterizar quimicamente as cervejas e detectar pequenas variações ao nível dos compostos minoritários.

A Espectroscopia de RMN em conjunto com a Análise em Componentes Principais, mostrou ser um potencial método para detectar diferenças na composição química de cervejas produzidas em diferentes países e em diferentes datas.

Em relação à composição alifática, detectou-se que o conteúdo dos ácidos láctico e pirúvico variam significativamente na cerveja, consoante o país de origem. Esta variação pode reflectir a qualidade e/ou o número de gerações da levedura. Em relação às datas de produção, não se observaram diferenças entre as amostras do país A mas o mesmo não aconteceu com as amostras dos países B e C, mostrando que existem diferenças no processo de fabrico que provocam diferenças na composição química.

A análise da região dos açúcares dos espectros de RMN permitiu detectar que existem diferenças no grau de ramificação das dextrinas consoante o país de origem e no caso do país C, também consoante a data de fabrico. As dextrinas lineares predominam nas cervejas do país B enquanto que as dextrinas ramificadas predominam nas cervejas produzidas nos países A e C. No caso do país C, como já foi referido, existe uma fraca reprodutibilidade entre as datas de fabrico, pois as amostras C3 são as que apresentam teores mais baixos de dextrinas ramificadas. Estas variações podem ser correlacionadas com as condições de processamento, principalmente da maltagem e da brassagem, que influenciam a actividade das enzimas.

Finalmente, todos os locais de produção podem ser distinguidos com base no conteúdo em adenosina/inosina, uridina, tirosina/tirosol e 2-feniletanol e, mais uma vez, a reprodutibilidade entre as datas de fabrico é pobre no caso do país C. A presença de tirosol e 2-feniletanol na cerveja final pode ser indicativa da degradação de Strecker de alguns aminoácidos.

As diferenças encontradas na composição química, podem ter origem em pequenas variações nas condições do processo de fabrico, nomeadamente, temperatura ambiente, qualidade da água, condições e métodos de trabalho, tipo de equipamento, etc. O método de PCA/RMN pode, consequentemente, ser um método útil para monitorizar e controlar o processo de fabrico da cerveja.

Referências

Almeida, C.; Duarte, I.; Barros, A.; Rodrigues, J.; Spraul, M.; Gil, A. – “Composition of Beer by ^1H NMR Spectroscopy: Effects of Brewing Site and Date of Production” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54; 700-706; 2006.

Almeida, C. M.; Vasconcelos, M. T. – “ICP-MS determination of strontium isotope ratio in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin” – *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*; 16; 607-611; 2001.

Antonelli, A.; Zeppa, G.; Gerbi, V.; Carnacini, A. – “Polyalcohols in vinegar as an origin discriminator” – *Food Chemistry*; 60; 403-407; 1997.

Barros, A.S. – “Contribution à la selection et la comparaison de variables caractéristiques” – *Ph.D. Thesis*; Institut National Agronomique Paris-Grignon; France; 1999.

Baxter, M.; Crews, H.; Dennis, M.; Goodall, I.; Anderson, D. – “The determination of the authenticity of wine from its trace element composition” – *Food Chemistry*; 60; 443-450; 1997.

Brescia, M.; Caldarola, V.; Giglio, A.; Benedetti, D.; Fanizzi, F.; Sacco, A. – “Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determination” – *Analytica Chimica Acta*; 458; 177-186; 2002.

Cross, J.; Gallaher, T.; Leary, J. – “The Application of Site-Specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) to the Analysis of Alcoholic Beverages” – *The Chemical Educator*; vol.3; No. 5; Springer-Verlag New York, Inc.; 1998.

Duarte, I. – “Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Vibrational Spectroscopy for the Characterisation of Fruit Products and Beverages” – *Ph.D. Thesis*, Universidade de Aveiro; 2003.

Duarte, I.; Godejohann, M.; Braumann, U.; Spraul, M.; Gil, A. – “Application of NMR Spectroscopy and LC-NMR/MS to the Identification of Carbohydrates in Beer” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51; 4847-4852; 2003.

Duarte, I.; Barros, A.; Almeida, C.; Spraul, M.; Gil, A. – “Multivariate Analysis of NMR and FT-IR Data as a Potential Tool for the Quality of Beer” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52; 1031-1038; 2004.

Fernández, P.L.; Pablos, F.; Martín, M.; González, A. G. – “Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50; 1833-1839; 2002.

Héberger, K.; Csomós, E.; Simon-Sarkadi, L. – “Principal Component and Linear Discriminant Analyses of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Hungarian Wines” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51; 8055-8060; 2003.

Hughes, P.S.; Baxter, E.D. – “Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects” – *The Royal Society of Chemistry*; Cambridge; 2001.

Košir, I.; Kocjančič, M.; Ogrinc, N.; Kidrič, J. – “Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines)” – *Analytica Chimica Acta*; 429; 195-206; 2001.

Lachenmeier, D. W.; Frank, W.; Humpfer, E.; Schafer, H.; Keller, S.; Mortter, M.; Spraul, M. – “Quality Control of Beer using High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis” – *European Food Research and Technology*; 220; 215-221; 2005.

Marcos, A.; Fisher, A.; Rea, G.; Hill, S. – “Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea” – *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*; 13; 521-525; 1998.

Ogrinc, N.; Košir, I.; Kocjančič, M.; Kidrič, J. – “Determination of Authenticity, Regional Origin, and Vintage of Slovenian Wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR Analysis” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49; 1432-1440; 2001.

Ogrinc, N.; Košir, I.; Spangenberg, J.; Kidrič, J. – “The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review” – *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 376; 424-430; 2003.

Rossmann, A. – “Determination of Stable Isotope Ratios in Food Analysis” – *Food Reviews International*; 17(3); 347-381; 2001.

Taylor, V.; Longerich, H.; Greenough, J. – “Multielement Analysis of Canadian Wines by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and Multivariate Statistics” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51; 856-860; 2003.

5 DETERMINAÇÃO DO LOCAL E DATA DE FABRICO DE CERVEJAS PRODUZIDAS NO MESMO PAÍS

5.1	<i>Introdução.....</i>	96
5.2	<i>Materiais e Métodos</i>	96
5.3	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de FT-IR.....</i>	98
5.4	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN.....</i>	100
5.5	<i>Conclusões.....</i>	115
	Referências	116

5.1 Introdução

Em Portugal, o consumo de cerveja é elevado e, como sabemos, uma mesma marca de cerveja pode ser produzida em vários centros produtivos localizados em diferentes regiões do país. Quando um consumidor bebe uma cerveja no norte ou no sul, espera que ela apresente as mesmas características sensoriais, independentemente da região onde foi produzida.

Com este estudo pretendeu-se avaliar se a composição química de um mesmo tipo e marca de cerveja, variam em função do local e data de fabrico. Neste caso, as amostras foram produzidas no mesmo país, ao contrário das amostras estudadas no capítulo anterior, cujos resultados foram publicados recentemente (Almeida *et al.*, 2006), que foram produzidas em diferentes países. Assim, pretendeu-se avaliar o problema numa dimensão diferente e, investigar se a proximidade dos centros produtivos permite o controlo mais efectivo das diferentes variáveis do processo, nomeadamente, tipo de levedura, qualidade do malte, temperatura, qualidade da água, tipo de equipamentos e modo operativo. Para isso, seleccionaram-se amostras de 3 centros produtivos, cuja qualidade do malte é igual. O lúpulo também é seleccionado de igual modo para os 3 locais e para minimizar ainda mais as diferenças, a água é tratada, quer por osmose inversa, quer por troca iónica, para igualar ou aproximar os níveis de sais nos diferentes processos de fabrico. As condições operativas são iguais, mas, no entanto, podem existir diferenças a nível da sala de fabrico, pois os equipamentos podem ser ligeiramente diferentes.

5.2 Materiais e Métodos

Amostras: Foram seleccionadas 27 cervejas do mesmo tipo e marca, produzidas em 3 locais/cidades (A, B e C) e em 3 datas diferentes (1, 2 e 3), espaçadas de 1-2 meses. De cada data de fabrico adquiriram-se 3 garrafas (a, b e c), como se pode ver na Tabela 5.1. As amostras foram armazenadas a 4 °C até à sua análise. Imediatamente antes da análise por RMN, as garrafas de cerveja foram abertas e desgaseificadas num banho ultra-sónico, durante 10 minutos e preparadas de modo a conterem 10% de D₂O e 0,02% de TSP, como

referência de desvio químico e de intensidade. As mesmas amostras desgaseificadas foram armazenadas a 4°C, durante 3-4 dias, até serem analisadas por FT-IR.

Tabela 5.1 Identificação das amostras de cerveja analisadas.

Codificação	Cidade	Data de Produção	Garrafa	pH
A1a	A	Nov-03	a	4,48
A1b	A	Nov-03	b	4,45
A1c	A	Nov-03	c	4,45
A2a	A	Jan-04	a	4,56
A2b	A	Jan-04	b	4,56
A2c	A	Jan-04	c	4,53
A3a	A	Mar-04	a	4,38
A3b	A	Mar-04	b	4,39
A3c	A	Mar-04	c	4,39
B1a	B	Dez-03	a	4,35
B1b	B	Dez-03	b	4,36
B1c	B	Dez-03	c	4,37
B2a	B	Jan-04	a	4,41
B2b	B	Jan-04	b	4,47
B2c	B	Jan-04	c	4,39
B3a	B	Mar-04	a	4,65
B3b	B	Mar-04	b	4,63
B3c	B	Mar-04	c	4,63
C1a	C	Dez-03	a	4,54
C1b	C	Dez-03	b	4,58
C1c	C	Dez-03	c	4,58
C2a	C	Fev-04	a	4,67
C2b	C	Fev-04	b	4,63
C2c	C	Fev-04	c	4,70
C3a	C	Abr-04	a	4,47
C3b	C	Abr-04	b	4,44
C3c	C	Abr-04	c	4,42

Métodos: Os espectros de FT-IR e os espectros de RMN de ^1H foram obtidos nos mesmos equipamentos e segundo as mesmas condições referidas no capítulo anterior. A Análise em Componentes Principais foi feita de igual modo e usando um programa co-desenvolvido pela Universidade de Aveiro e o Institut National Agronomique Paris-Grignon (Barros, 1999).

5.3 Análise dos Dados de Espectroscopia de FT-IR

Na Figura 5.1 estão representados espectros típicos de FT-IR, adquiridos com 128 varrimentos, de 3 amostras de cerveja, uma de cada local de fabrico, escolhidas aleatoriamente. Como se pode verificar, para além das fortes bandas de absorção da água (extensão - 3320 cm^{-1} e torção - 1640 cm^{-1}), os espectros de FT-IR das cervejas apresentam alguns picos na zona de $1500\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (zona da impressão digital), originados essencialmente por hidratos de carbono ($1155\text{--}1151\text{ cm}^{-1}$ e $1024\text{--}998\text{ cm}^{-1}$) e etanol (1087 cm^{-1} , 1045 cm^{-1} e 880 cm^{-1}), como se pode consultar na Tabela 2.9. Numa primeira observação dos espectros não são visíveis diferenças entre as amostras.

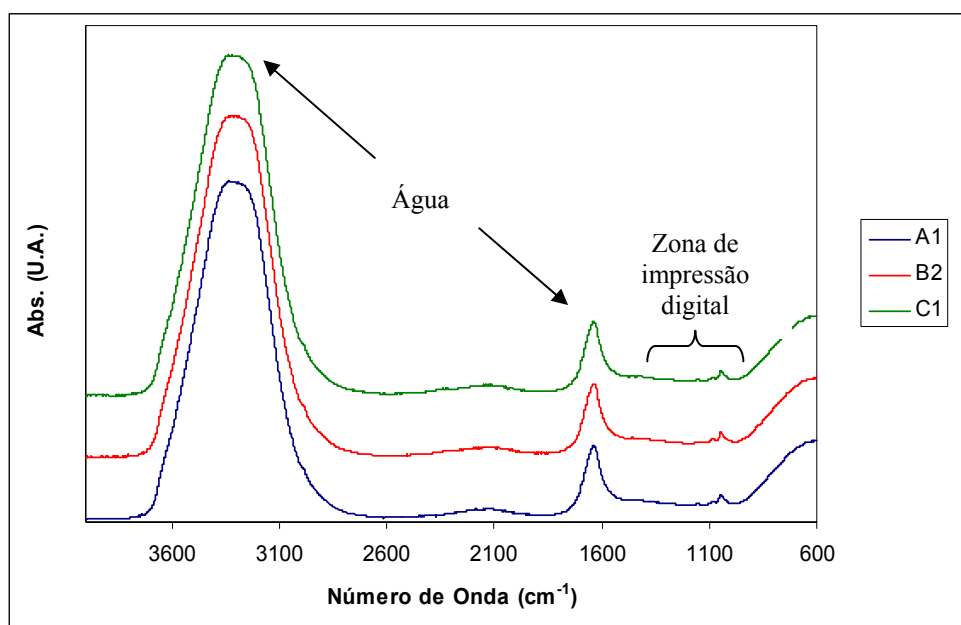


Figura 5.1 Espectros típicos de FT-IR ($4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$) de amostras de cerveja estudadas.

Na Figura 5.2, apresentam-se ampliações da região da impressão digital, dos mesmos espectros, identificando-se agora as bandas características do etanol (1087 cm^{-1} , 1045 cm^{-1}) e das dextrinas (1151 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} e 1024 cm^{-1}). Mais uma vez, não é possível perceber diferenças significativas entre os espectros, pela simples observação dos mesmos. Então, com o objectivo de detectar potenciais diferenças entre os espectros, não detectáveis por simples observação dos mesmos, realizou-se uma PCA da região $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ dos espectros das 27 amostras.

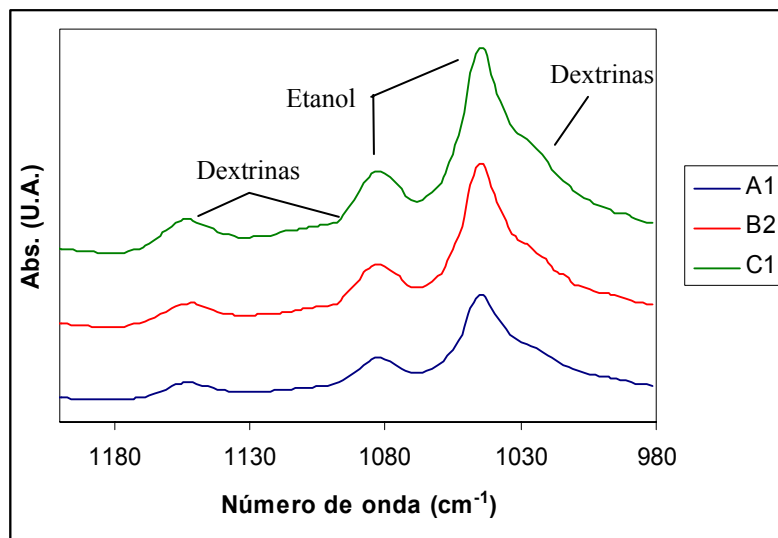


Figura 5.2 Região da impressão digital dos mesmos espectros de FT-IR apresentados na Figura 5.1.

Na Figura 5.3, estão representadas as coordenadas factoriais dos dois primeiros componentes principais, PC1 e PC2. As amostras foram identificadas conforme a Tabela 5.1. Ao analisar o mapa das coordenadas factoriais não é óbvio qualquer agrupamento específico de amostras, o que pode sugerir duas hipóteses: ou realmente não existem diferenças significativas entre as amostras de cerveja analisadas, ou então o FT-IR não é a técnica adequada para detectar essas diferenças, se existirem, pelo menos nesta região e com as condições usadas.

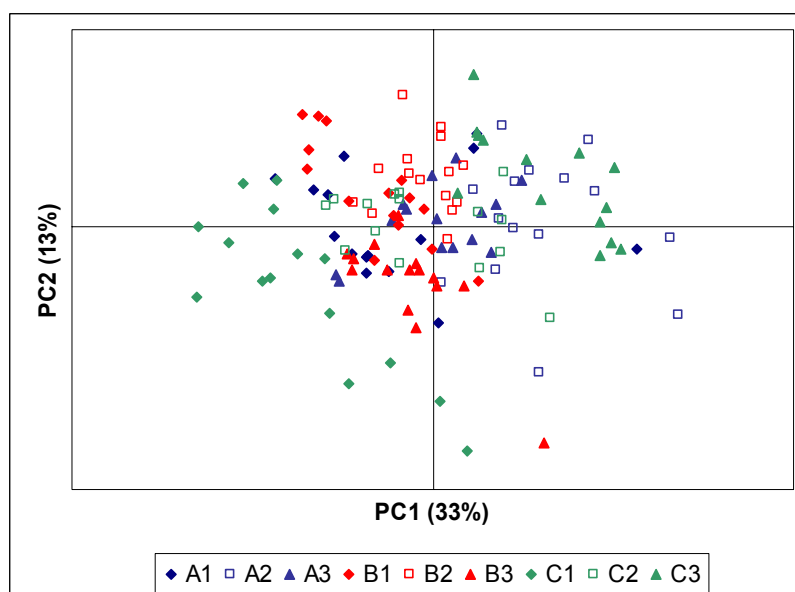


Figura 5.3 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) da região da impressão digital dos espectros das 27 amostras de cerveja estudadas.

5.4 Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN

Na Figura 5.4 estão representados os espectros de RMN de ^1H de cervejas, escolhidas aleatoriamente para cada um dos 3 locais de fabrico.

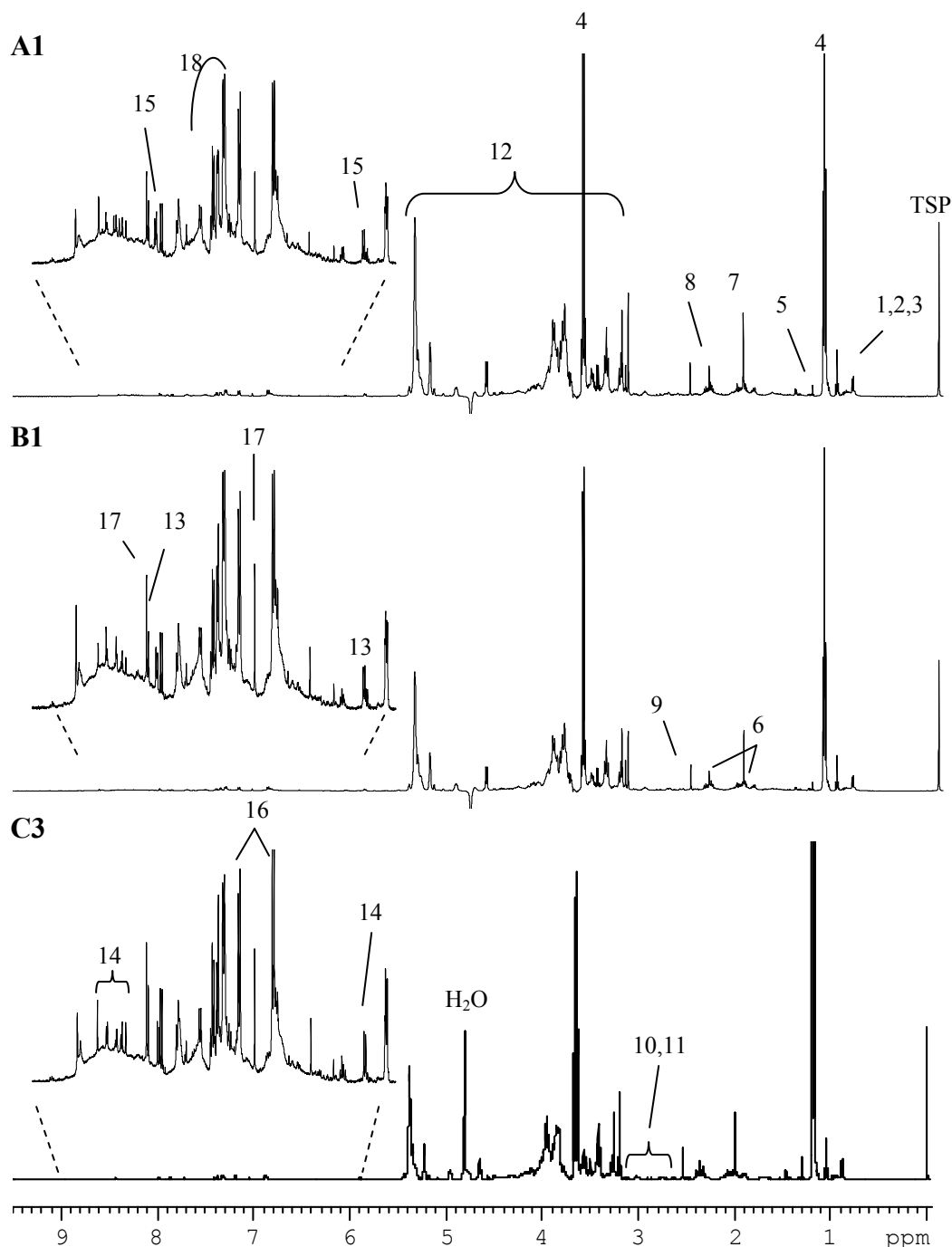


Figura 5.4 Espectros de RMN de ^1H de 3 cervejas, uma de cada local de fabrico (1-propanol, 2-isobutanol, 3-isopentanol, 4-etanol, 5-lático, 6-prolina, 7-acético, 8-pirúvico, 9-succínico, 10-cítrico, 11-málico, 12-dextrinas, 13-uridina, 14-adenosina/inosina, 15-citidina, 16-tirosina, 17-histidina, 18-fenilalanina).

Como se pode observar, os sinais mais intensos são devidos ao etanol, enquanto que os mais fracos são os da região aromática (5,8-10 ppm). Na região dos açúcares (3-5,8 ppm) observamos forte sobreposição de sinais devido à similaridade entre os ambientes químicos caracterizando os vários protões. Podemos, ainda, encontrar diversos sinais, tais como, álcoois (isopentanol, isobutanol e propanol), aminoácidos (prolina, histidina, fenilalanina e alanina), ácidos orgânicos (acético, pirúvico, succínico, cítrico e málico) e nucleósidos (uridina, citidina, adenosina e inosina).

Por simples inspecção visual dos espectros não é possível detectar diferenças, que possam ser relacionadas com o local de fabrico ou a data de produção, devido não só ao elevado número de picos e suas sobreposições, bem como à grande complexidade de cada sinal.

Assim, com o objectivo de procurar as principais fontes de variabilidade dos espectros de RMN de ^1H das amostras de cerveja analisadas, realizou-se uma PCA começando pela análise apenas da região alifática (0,5-3,1 ppm) dos espectros e excluindo o sinal do etanol (1,17 ppm).

O estudo por PCA foi feito sistematicamente por regiões espectrais, de forma a tentar detectar as variações nos compostos minoritários, especificamente de natureza alifática e aromática. Na região alifática observam-se contribuições de sinais de álcoois, aminoácidos e ácidos orgânicos alifáticos. A Figura 5.5 mostra o resultado obtido, na região em estudo.

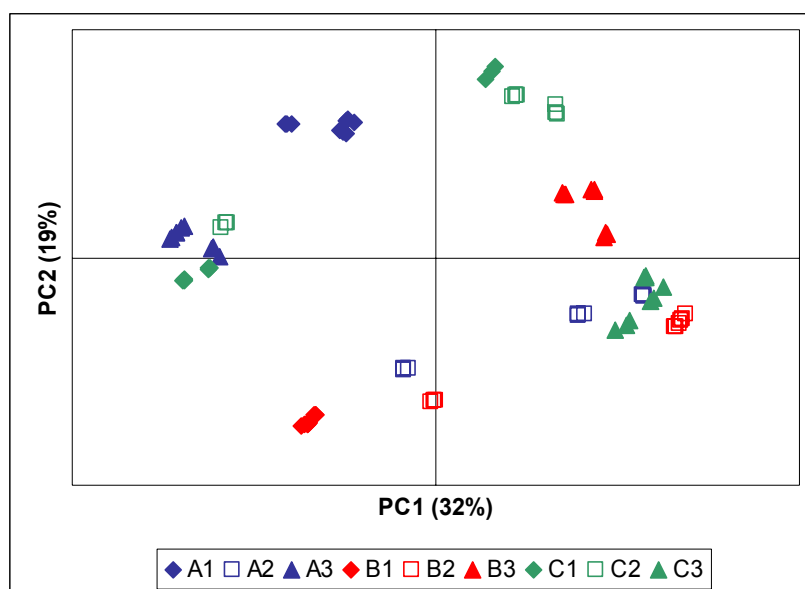


Figura 5.5 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) usando a região alifática dos espectros de RMN de ^1H (LB 0,3 Hz) das 27 amostras estudadas.

A distribuição das amostras não parece, no entanto, estar relacionada com o local de fabrico nem tão pouco com a data de produção. É de notar que, aparentemente se observam diferenças entre as garrafas do mesmo lote de fabrico, por exemplo, os grupos de amostras A2, B2, C1 e C2. Para investigar melhor esta observação, a análise do correspondente gráfico das contribuições factoriais (Figura 5.6), pode ajudar a explicar a origem das aparentes variações entre amostras, visíveis no gráfico de coordenadas factoriais (Figura 5.5).

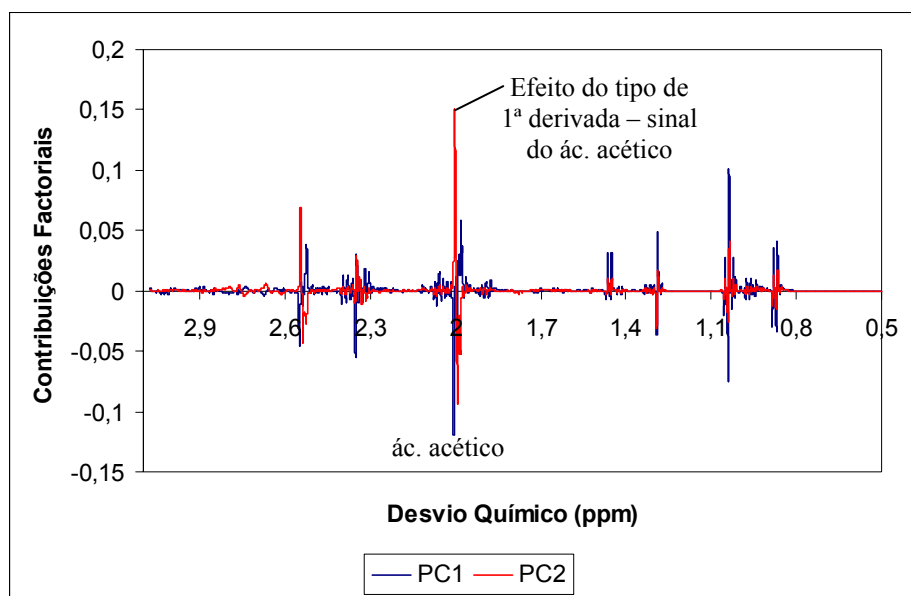


Figura 5.6 Contribuições factoriais de PC1 e PC2 (LB 0,3 Hz).

No entanto, a análise do gráfico da Figura 5.6 mostra que as principais diferenças se devem a alterações de desvio químico causadas por diferenças de pH ($\Delta\text{pH} = 0,35$) entre as amostras, alterações essas que originam efeitos do tipo de primeira derivada no gráfico das contribuições factoriais. Na figura indica-se um exemplo deste efeito para o sinal do ácido acético a 2,0 ppm. Para tentar minimizar estes efeitos, que não reflectem alterações de composição, os espectros de RMN foram processados com factores de LB superiores (2, 5 e 10 Hz), o que faz diminuir a resolução espectral, diminuindo, em princípio, a influência dos artefactos. Na Figura 5.7 podemos ver o resultado da PCA aplicada também à região alifática desses espectros.

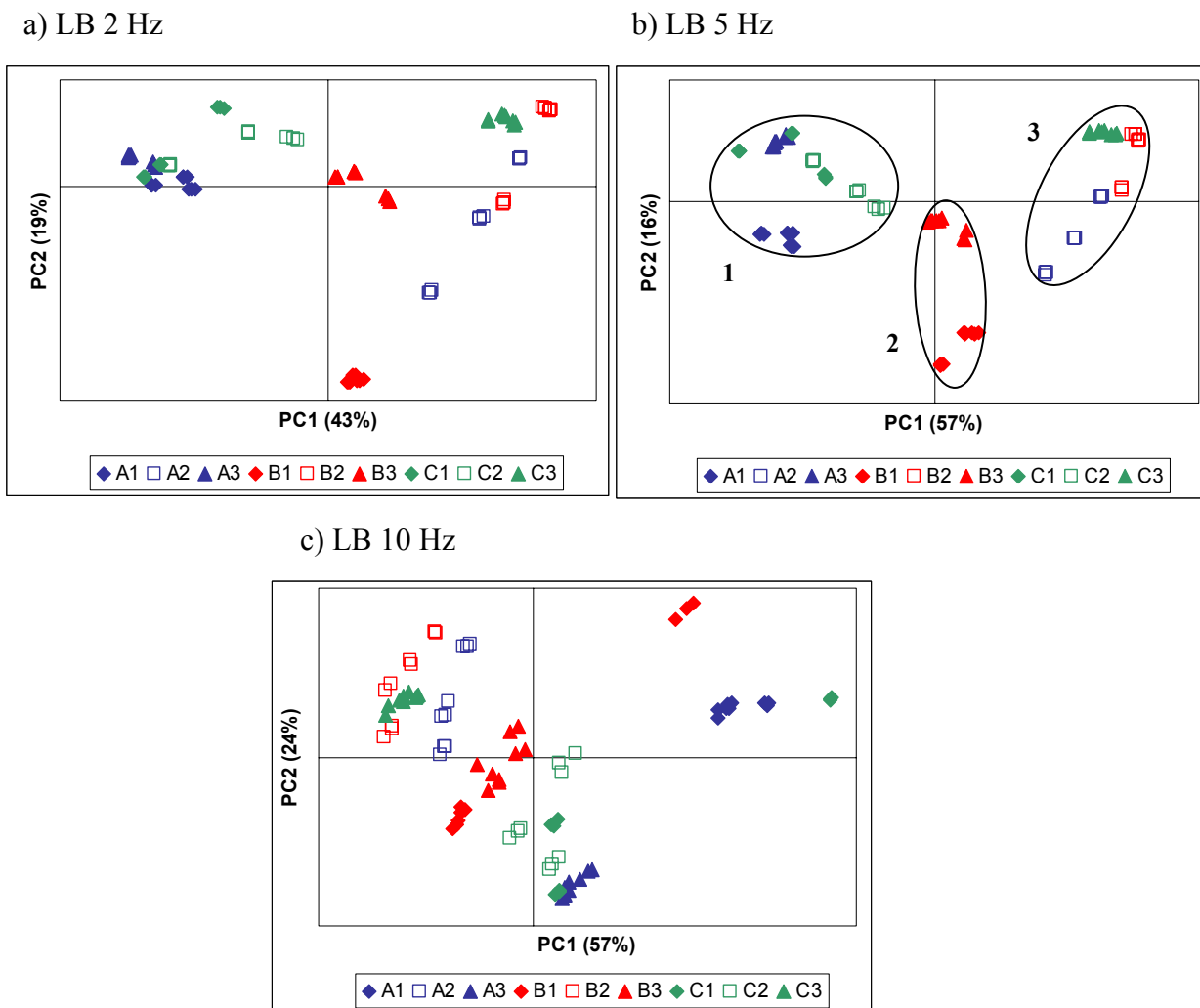


Figura 5.7 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) usando a região alifática dos espectros de RMN de ^1H a) LB 2 Hz, b) LB 5 Hz e c) LB 10 Hz.

Como se pode observar a melhor separação das amostras, em função do local de fabrico, ocorre quando se usam os espectros processados com LB 5 Hz (Figura 5.7-b). Por exemplo, é de notar a aproximação das amostras B1 e B3, pertencentes ao grupo B, assim como as amostras A2 e C2. Assim, podem considerar-se 3 grupos, onde já não se verifica a separação por lote de fabrico, ou seja, não há separação entre garrafas produzidas na mesma data, como na PCA dos espectros processados com LB 0,3 Hz. Isto parece sugerir que as diferenças entre amostras de garrafas produzidas na mesma data correspondem a pequenas diferenças de pH. A separação evidenciada pelos grupos 1, 2 e 3 indicados acima revela-se de maior importância como é explicado a seguir.

O grupo 1, constituído pelas amostras A1, A3, C1 e C2, está situado no PC1 negativo e analisando o gráfico das contribuições factoriais de PC1 (Figura 5.8), verifica-se que estas amostras apresentam um conteúdo mais elevado de ácido pirúvico, que as restantes. Como se sabe, na fermentação alcoólica das leveduras, o ácido pirúvico é, numa primeira etapa, descarboxilado em dióxido de carbono e acetaldeído, sob acção da enzima piruvato descarboxilase, que tem por coenzima o pirofosfato de tiamina (ou vitamina B₁), que contém zinco (Zn²⁺) (Campos, 1998; Ricardo e Teixeira, 1993). Se o ácido pirúvico está em excesso, é porque houve alguma deficiência na sua descarboxilação. Isso pode ter acontecido, caso a filtração do mosto tenha provocado uma retenção elevada de micronutrientes, neste caso, do zinco, e realmente, tanto no centro produtivo A, como em C, o equipamento de filtração é semelhante e provoca retenção de mais micronutrientes que no centro produtivo B. É de salientar ainda que as cervejas deste grupo obtiveram todas uma classificação não satisfatória no controlo da estabilidade organoléptica (informação fornecida pelo laboratório da indústria fornecedora das amostras), o que mostra que a PCA detectou diferenças nestas cervejas, também detectáveis pelo painel de provadores que as avaliaram. As diferenças podem estar relacionada com o descrito anteriormente ou com outras propriedades não identificáveis.

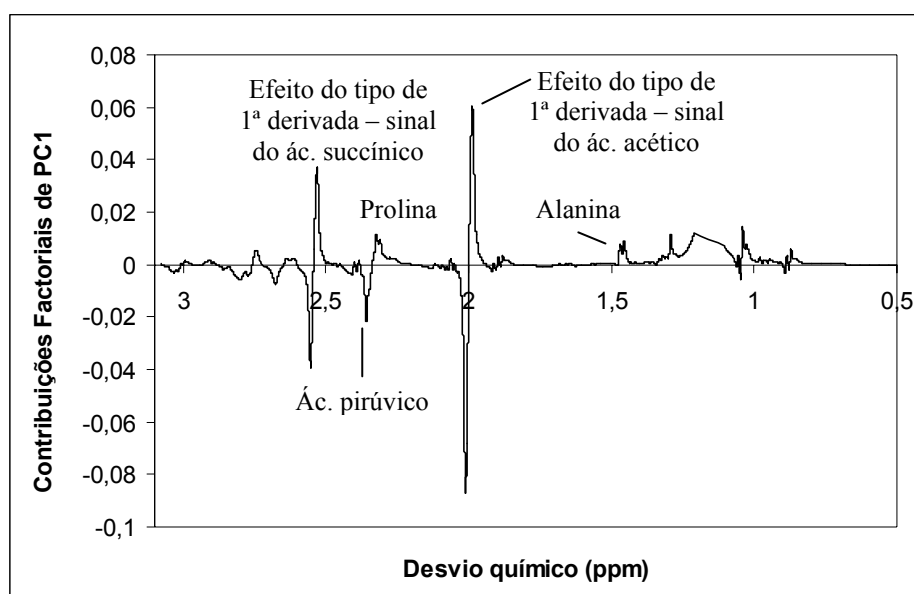


Figura 5.8 Contribuições factoriais de PC1 (Região alifática – LB 5 Hz).

O grupo 2, constituído pelas amostras B1 e B3, está situado no PC2 negativo e é caracterizado por um teor mais elevado de ácido acético e ácido succínico (Figura 5.9). Neste caso, a extensão do ciclo de Krebs foi maior, uma vez que temos maior teor destes compostos (Campos, 1998). Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez, que no centro produtivo B, o equipamento de filtração, permite que o mosto seja mais concentrado em lípidos, nomeadamente, ácidos gordos insaturados, que podem ser incorporados directamente pela levedura, levando a um arranque mais rápido da fermentação (Hughes e Baxter, 2001).

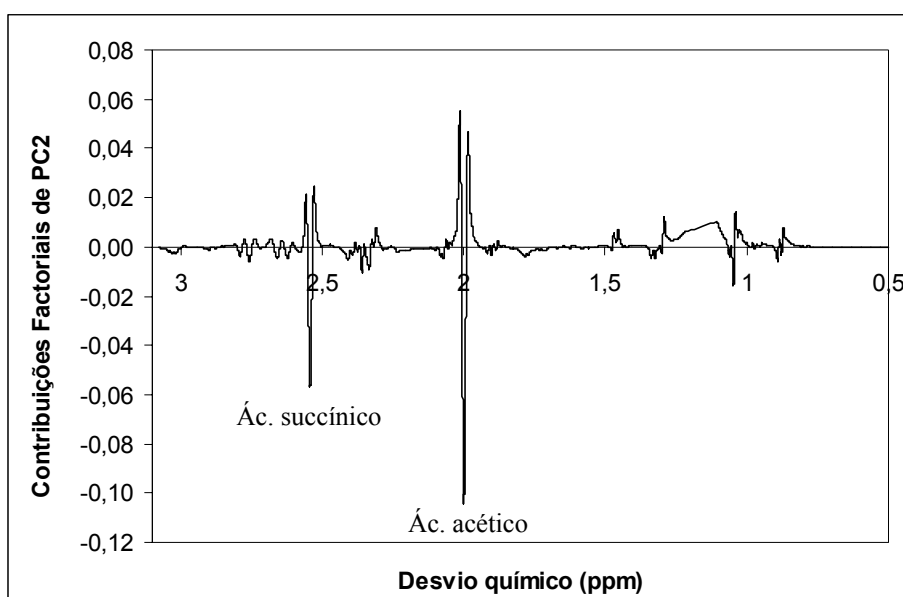


Figura 5.9 Contribuições factoriais de PC2 (Região Alifática – LB 5 Hz).

Por sua vez, o grupo 3, localizado na parte positiva do eixo de PC1, é constituído pelas amostras A2, B2 e C3, que são caracterizadas por terem um teor mais elevado de alanina e prolina. Tanto no centro produtivo A como em C, a velocidade de fermentação e de agitação é bastante rápida, o que dificulta o controlo do processo. Deste modo, é de esperar que o teor de aminoácidos possa variar em função da fermentação local. A amostra B2 parece ser uma amostra atípica, uma vez que não encaixa nas explicações dos diferentes grupos.

De forma a confirmar os resultados obtidos pela PCA, comparou-se a região alifática dos espectros de 3 cervejas, uma de cada grupo (1, 2 e 3). Verificou-se, que a amostra A1

apresenta teores mais elevados de ácido pirúvico, a amostra B1 contém maiores quantidades de ácidos succínico e acético enquanto que a amostra C3 apresenta picos mais intensos de alanina e prolina, confirmando assim os resultados da PCA.

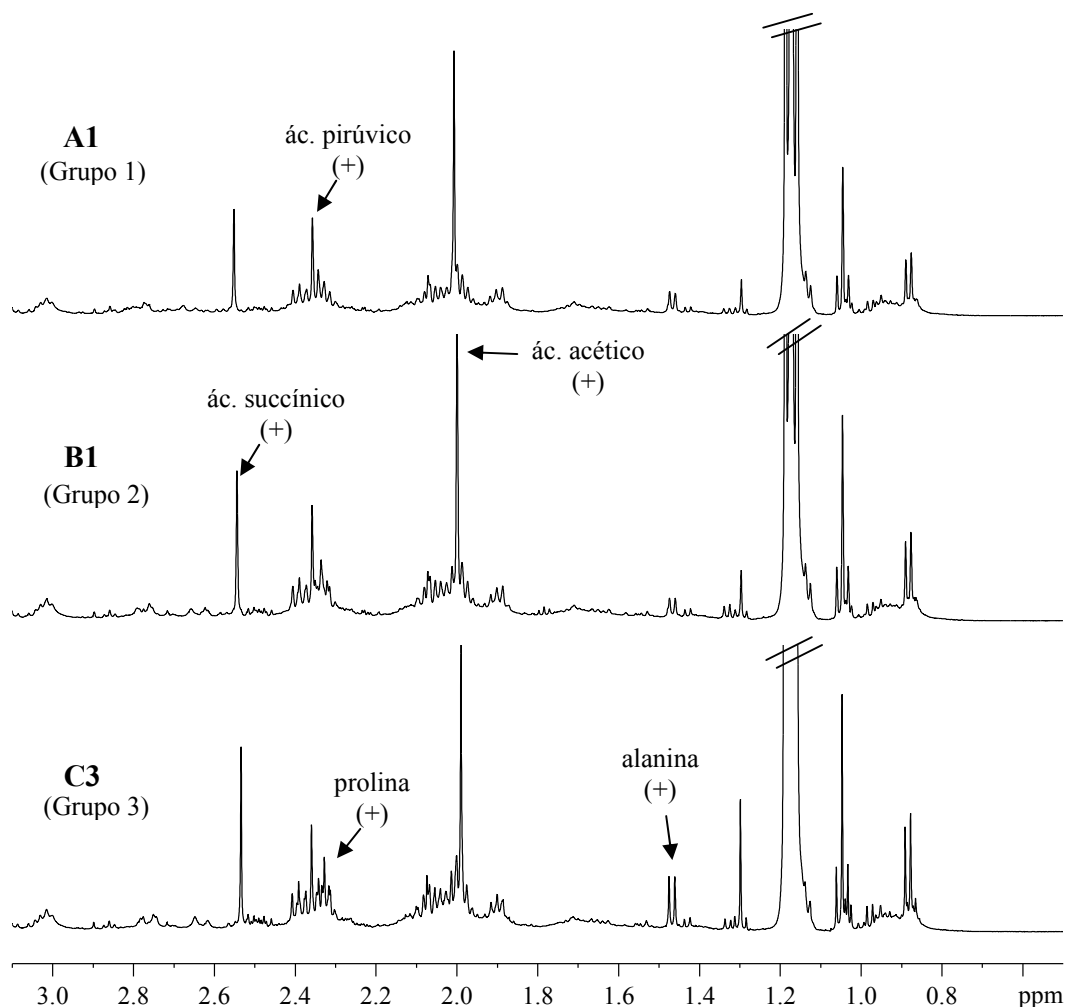


Figura 5.10 Região alifática dos espectros de RMN de ^1H de 3 cervejas, uma de cada grupo (1, 2 e 3).

Em suma, embora não se consiga uma separação de amostras correlacionável com o local de fabrico, pode ver-se, claramente, a variabilidade existente entre algumas datas de produção. Assim, as amostras produzidas na cidade A, em Janeiro de 2004 (A2) são diferentes das produzidas nas outras duas datas (A1 e A3 – veja-se a Tabela 5.1 para identificação dessas datas), uma vez que se encontram em grupos distintos. Também acontece o mesmo com as cervejas produzidas em Janeiro de 2004, mas no centro

produtivo B (B2), que estão separadas das restantes produzidas nesse centro, agrupadas no grupo 2. Com as amostras do centro C, também se verifica que uma data se diferencia das restantes duas. Essas amostras foram produzidas em Abril de 2004 (C3) e estão contidas no grupo 3. A razão para estas diferenças de composição entre as amostras fabricadas em datas distintas poderá ter a ver com as condições de fermentação, nomeadamente, estado da levedura, temperatura ambiente, controlo de parâmetros específicos do processamento, equipamento usado na sala de fabrico, entre muitos outros, o que se reflecte na estabilidade organoléptica das cervejas. Deste modo, não existem diferenças correlacionáveis com o local de fabrico, mas sim diferenças casuais, relacionáveis com as condições de processamento.

De seguida, a PCA foi aplicada à região dos açúcares (3,1-5,8 ppm), onde tal como o nome indica, se encontram sinais de açúcares (dextrinas, essencialmente) e também de alguns álcoois.

Na Figura 5.11 estão representadas as coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) da PCA aplicada a esta região dos espectros de RMN de ^1H , processados com LB 0,3 Hz (espectros originais). Nesta figura, podemos observar 3 grupos, onde se nota uma grande dispersão das amostras, ou seja, todos os grupos contêm contribuições de todos os locais de fabrico. Uma vez mais, o efeito do tipo de primeira derivada, observado nas contribuições factoriais (não mostradas), pareceu condicionar os resultados observados. Por este motivo, processaram-se os espectros com diferentes valores de LB, tendo-se seleccionado os resultados obtidos com o LB 5 Hz para discussão.

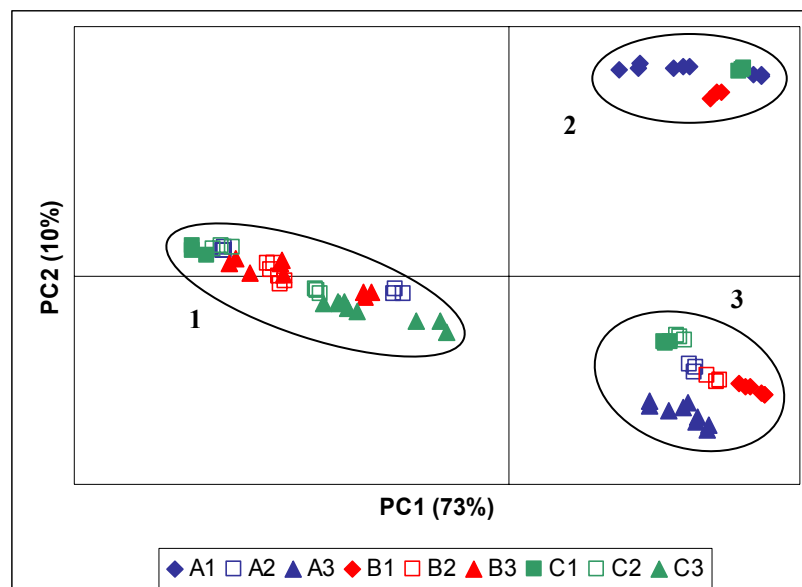


Figura 5.11 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) usando a região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H (LB 0,3 Hz).

Na Figura 5.12 estão representadas as coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) da PCA aplicada à região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H , processados com LB 5 Hz.

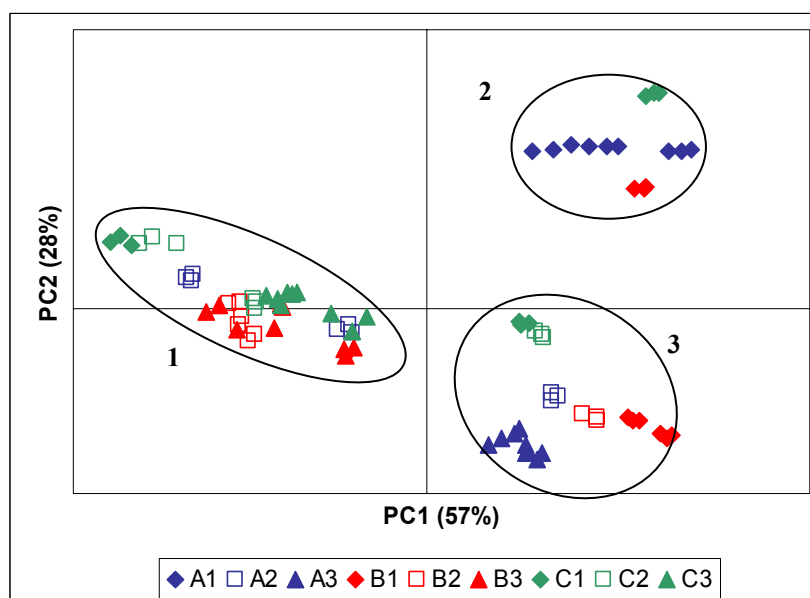


Figura 5.12 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) usando a região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H (LB 5 Hz).

Como se pode observar, por comparação da Figura 5.11 com a Figura 5.12, a distribuição das amostras é semelhante. Isto confirma que, tendo em conta a composição em açúcares, não é possível, agrupar as amostras em termos de local de fabrico, mas que parece haver grande variabilidade, em todos os locais, em termos de data de fabrico. Veja-se, por exemplo, as amostras do centro de produção A: as produzidas em Novembro de 2003 (A1) estão contidas no grupo B, as Janeiro de 2004 (A2), estão dispersas pelos grupos A e C e as de Março de 2004 (A3) estão no grupo C. Isto significa que a variabilidade na composição em açúcares, originada por datas diferentes de produção, é mais importante que variações entre locais de fabrico, mostrando que não existem diferenças efectivas entre os centros de produção e que as diferenças são pontuais, talvez causadas por variações nas condições de processamento.

Analisando o gráfico das contribuições factoriais (Figura 5.13), para tentar perceber o porquê da separação, verificamos que o grupo 1, com PC1 negativo, é caracterizado por serem amostras com maior teor de açúcares simples e pequenos, como é o caso da glucose e da maltose (sinais característicos a 4,63 (H1 β red), 5,21 (H1 α red) e 5,37 (H1 α , 1 \rightarrow 4) ppm). Em contrapartida, os grupos 2 e 3, com PC1 positivo, têm maior teor de açúcares ramificados, como é o caso das dextrinas (sinais característicos a 4,96 (H1 α , 1 \rightarrow 6) e a 5,3-5,4 (H1 α , 1 \rightarrow 4) ppm). O que separa o grupo 2 do 3 é o PC2: para um PC2 positivo (grupo 2) temos um maior teor de glucose (sinais característicos a 5,37 (H1 α , 1 \rightarrow 4) e 5,21 (H1 α red) ppm).

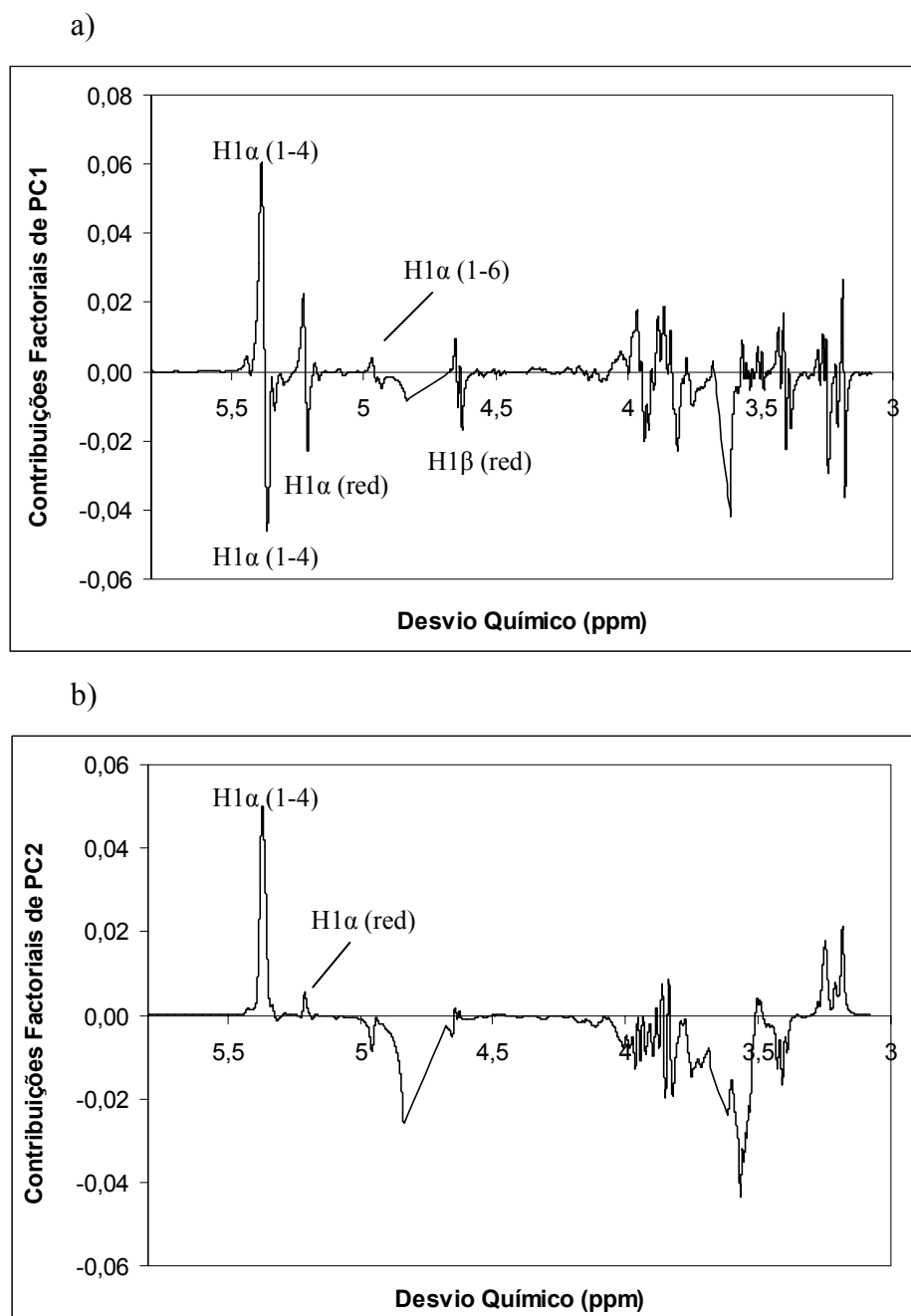


Figura 5.13 Contribuições factoriais de a) PC1 e b) PC2 (região dos açúcares – LB 5 Hz).

Na Figura 5.14 estão apresentadas as regiões dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H de 3 cervejas, uma de cada grupo (1, 2 e 3). Como se pode ver, pela simples observação dos espectros não são detectáveis diferenças, que possam estar relacionadas com a separação das amostras.

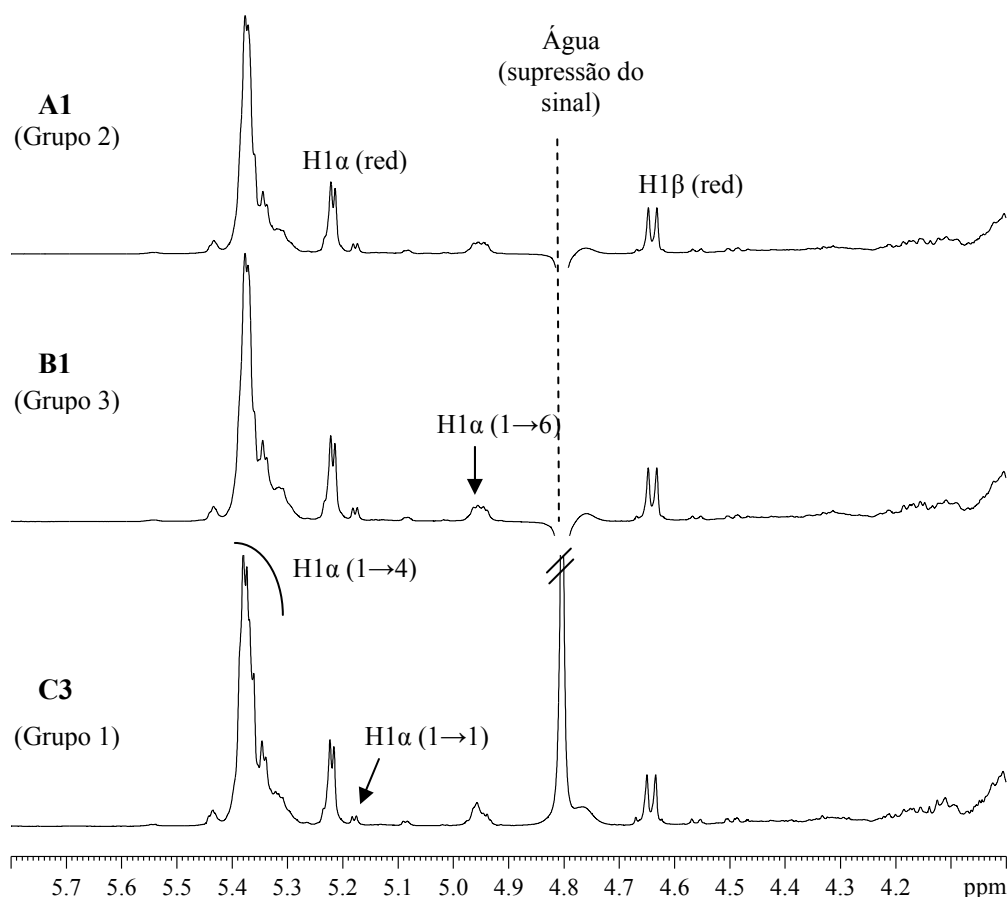


Figura 5.14 Região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H de 3 cervejas, uma de cada grupo (1, 2 e 3).

Verifica-se também que na disposição das amostras no gráfico das coordenadas factoriais de PC1 vs. PC3 (Figura 5.15), se pode agora, observar claramente, a separação das amostras por local de produção (azul-A, vermelho-B e verde-C) no eixo PC3. No entanto, a variabilidade explicada por este PC é apenas de 9%, confirmando que as diferenças entre os locais de fabrico são muito ténues. A explicação destas diferenças, com base na contribuição factorial PC3 (Figura 5.16) não é muito clara, mas o suficiente para se poder dizer que as amostras do centro produtivo C (PC3 negativo) têm maior teor de açúcares ramificados que as do B e isso poderá ser devido a, mais uma vez, diferenças das condições de fermentação, estado da levedura, diferenças a nível de equipamento da sala de fabrico, etc. Uma explicação para tal, pode ser o facto de em B, o arranque da fermentação ser mais rápido, e por isso, a levedura é mais eficiente. Em contrapartida, o processo é mais lento na sala de fabrico, possibilitando um tempo de hidrólise mais

elevado, ou seja, a α -amilase pode hidrolisar um maior número de açúcares e por isso é que as amostras do centro B têm açúcares menos ramificados (Hughes e Baxter, 2001).

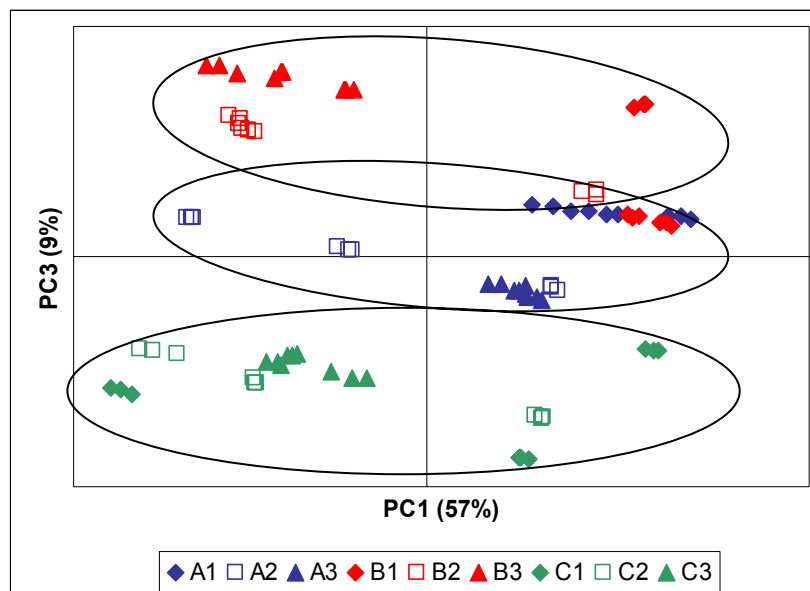


Figura 5.15 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC3) usando a região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H (LB 5 Hz).

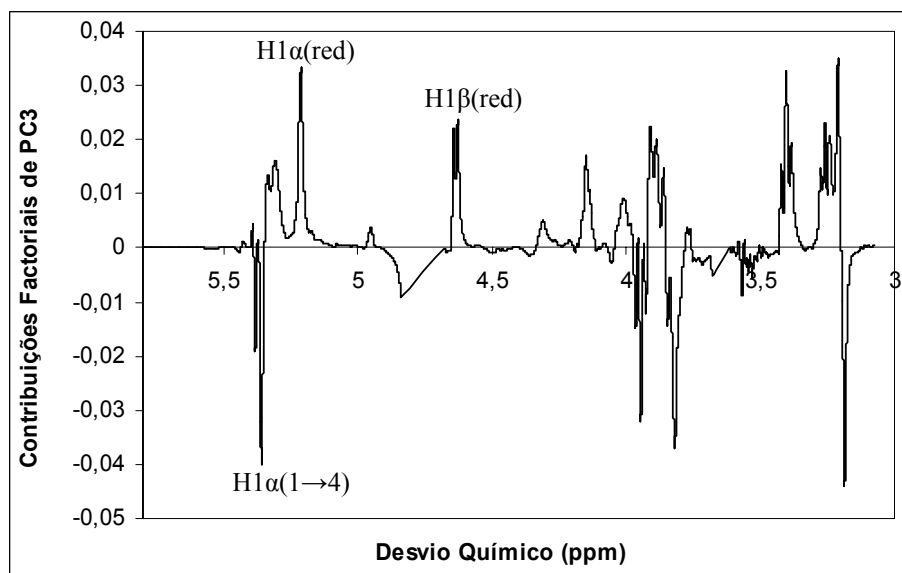


Figura 5.16 Contribuição factorial de PC3 (região dos açúcares – LB 5 Hz).

É de notar também uma grande dispersão das amostras ao longo do eixo de PC1, que volta a mostrar a variabilidade em termos de data de fabrico. Também se observa variabilidade entre garrafas do mesmo lote, que pode ser devida a fermentações que ocorram no interior das garrafas, causadas pela presença de quantidades vestigiais de leveduras selvagens, que tenham contaminado as amostras aquando da sua preparação e análise por RMN. Estas vão consumindo os açúcares e por isso é que, principalmente, nesta região se observa a variabilidade entre garrafas.

Procedeu-se de seguida à análise da região aromática (5,8-10,3 ppm), que mostra ressonâncias provenientes de compostos aromáticos, nomeadamente, aminoácidos e nucleósidos. A aplicação da PCA a esta região mostra a separação das amostras em 2 grupos principais: grupo 1 (amostras B2 e B3) e grupo 2, contendo as restantes amostras, como se pode ver na Figura 5.17, isto é, não há alterações significativas da composição aromática em termos de local de produção, notando-se apenas para uma ligeira diferença para as amostras do centro B, produzidas em Janeiro e Março de 2004 (B2 e B3).

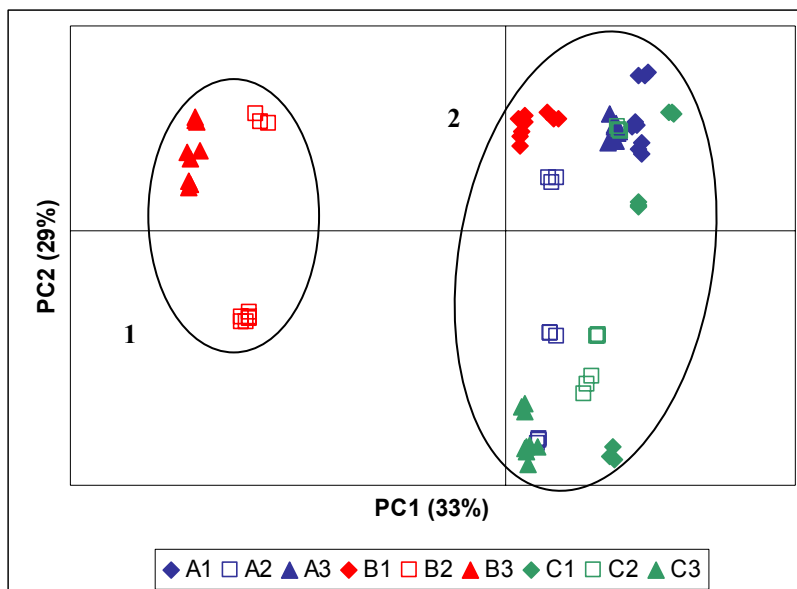


Figura 5.17 Coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) usando a região aromática dos espectros de RMN de ^1H (LB 5 Hz).

Da análise do gráfico das contribuições factoriais de PC1 (Figura 5.18), podemos concluir que as cervejas do grupo 1, com PC1 negativo, são caracterizadas por terem teores mais elevados de tirosina/tirosol e fenilalanina e teores menores de uridina, citidina e histidina, relativamente às restantes cervejas. Esta diferença poderá estar relacionada, com o facto de no centro produtivo B, a levedura ser mais eficiente, ou então a agitação ter sido maior, o que levou à utilização da terceira família de aminoácidos, tirosina, triptofano e fenilalanina, para produzir tirosol, triptofol e feniletanol, respectivamente.

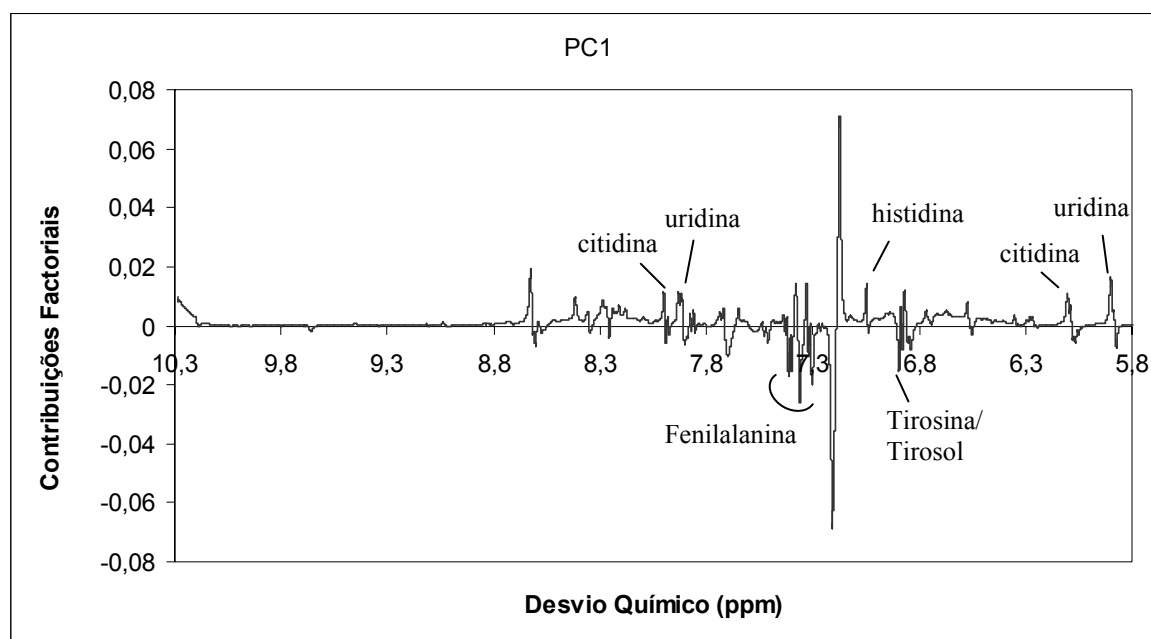


Figura 5.18 Contribuição factorial de PC1 (região aromática – LB 5 Hz).

Na Figura 5.19 estão representadas as regiões aromáticas dos espectros de RMN de ^1H de duas cervejas produzidas no mesmo local, em datas diferentes (B1 e B3) e que se encontram em grupos distintos no mapa das coordenadas factoriais PC1 vs. PC2. Devido à elevada complexidade dos espectros nesta região, não é fácil perceber diferenças que possam explicar a separação. No entanto, pode-se notar uma intensidade maior nos picos da fenilalanina, no espectro da amostra B3, enquanto que o pico da histidina (7,04 ppm) é mais intenso no espectro da amostra B1, confirmando assim alguns resultados da PCA.

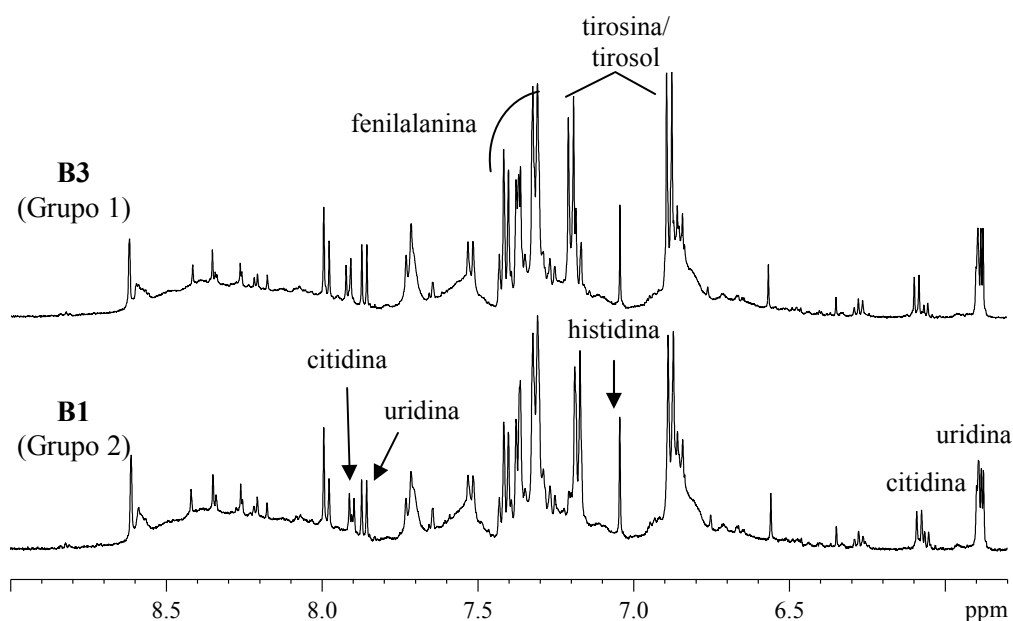


Figura 5.19 Região aromática dos espectros de RMN de ^1H de 2 cervejas: B3 (grupo 1) e B1 (grupo 2).

5.5 Conclusões

Como se viu, a Análise em Componentes Principais (PCA) dos espectros de FT-IR das amostras de cerveja produzidas no mesmo país não mostrou separação, nem em termos de local de fabrico, nem em termos de data de produção. Este facto pode sugerir duas hipóteses: ou realmente não existem diferenças entre as amostras de cerveja analisadas, ou então o FT-IR não é a técnica adequada para detectar essas diferenças. Mas, face aos resultados obtidos por RMN sugere-se que, realmente, existem diferenças entre as amostras, principalmente em termos de data de fabrico, consequência de pequenas variações nas condições de processamento.

A Análise em Componentes Principais da região alifática (isto é em termos de composição em compostos alifáticos) dos espectros de RMN de ^1H sugere a separação das amostras em 3 grupos, que, no entanto, não correspondem aos 3 locais de fabrico. Verifica-se sim, uma variabilidade importante, para cada local de produção, entre algumas datas de produção, o que poderá significar que as diferenças entre as amostras se devem a diferentes condições de fermentação, e processamento, nomeadamente, ao nível dos equipamentos da sala de fabrico.

A análise da região dos açúcares também mostrou a separação das amostras em 3 grupos, mostrando estes, grande variabilidade em termos de local e data de fabrico. Essa separação deve-se à diferente composição e teor de açúcares. A análise do componente principal PC3 permitiu a separação das amostras por local de fabrico, mostrando que as amostras do centro produtivo C têm maior teor de açúcares mais ramificados que as do B, e isso poderá ser devido a, mais uma vez, diferenças nas condições de fermentação, estado da levedura e, principalmente, diferenças no equipamento da sala de fabrico dos diferentes centros.

Nesta região também se observa variabilidade entre garrafas do mesmo lote, que pode ser devida a alterações dentro da própria garrafa, causadas por vestígios de leveduras selvagens, que, porventura, tenham contaminado as amostras aquando da preparação e análise das mesmas.

A PCA na região aromática separa as amostras em 2 grupos, com base nos teores de alguns aminoácidos e nucleósidos. No entanto, não existem indícios que a separação tenha a ver com o local de fabrico. Quanto à data de produção, verifica-se que as amostras produzidas em B, em Janeiro e Março (B2 e B3), se distanciam das restantes, no mapa das coordenadas factoriais, apresentando teores mais elevados de fenilalanina, tirosina e tirosol.

Em suma, os resultados mostraram que dentro do mesmo país, as diferenças mais significativas entre as amostras, não têm a ver com o local de produção, mas sim com a data de fabrico. Verificaram-se alterações que podem estar relacionadas com as condições de processamento, nomeadamente temperatura, estado da levedura e condições de armazenamento.

Referências

Almeida, C.; Duarte, I.; Barros, A.; Rodrigues, J.; Spraul, M.; Gil, A. – “Composition of Beer by ¹H NMR Spectroscopy: Effects of Brewing Site and Date of Production” – Journal of Agricultural and Food Chemistry; 54; 700-706; 2006.

Barros, A.S. – “Contribution à la selection et la comparaison de variables caractéristiques” – *Ph.D. Thesis*; Institut National Agronomique Paris-Grignon; France; 1999.

Campos, L.S. – “Entender a Bioquímica – o metabolismo fundamental em animais e plantas”; Escolar Editora; Lisboa; 1998.

Hughes, P.S.; Baxter, E.D. – “Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects” – The Royal Society of Chemistry; Cambridge; 2001.

Ricardo, C.; Teixeira, A. – “Moléculas Biológicas – estrutura e propriedades” – Didáctica Editora, Lisboa, 1993.

6 APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE RMN AO ESTUDO DO PROCESSO DE FABRICO DA CERVEJA

6.1	<i>Introdução.....</i>	120
6.2	<i>Materiais e Métodos</i>	121
6.3	<i>Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN.....</i>	122
6.4	<i>Conclusões</i>	134
	Referências	135

6.1 Introdução

Tal como foi referido na introdução, a produção de cerveja foi uma das primeiras aplicações da biotecnologia. A transformação da cevada em malte, a extracção das matérias-primas na brassagem e a bio-conversão das substâncias nutritivas do mosto pela levedura (álcool e outros metabolitos) são a resultante de reacções bioquímicas. A actividade das enzimas catalizadoras daquelas reacções e a sua formação dependem das características genéticas da cevada, da estirpe da levedura e da sua expressão fenotípica, tendo em conta as variações do meio e a tecnologia utilizada.

Contrariamente ao vinho, o mosto da cerveja é fabricado e a sua composição pode ser regulada, dentro de certos limites.

O objectivo da fermentação é, em primeiro lugar, produzir uma cerveja com o perfil de aroma e gosto que corresponda aos desejos do consumidor. Este aspecto do problema é difícil de atingir e manter, necessitando de longos estudos das regulações bioquímicas implicadas. Actualmente, podemos dizer que a maior parte daquelas regulações estão compreendidas, os compostos resultantes da fermentação e participantes no aroma e gosto da cerveja podem ser apreciados sensorialmente, apesar do limite de percepção ser por vezes muito baixo, mantendo-se, no entanto, difícil e morosa a sua quantificação analítica. Apesar dos mecanismos bioquímicos estarem hoje elucidados, a indústria cervejeira continua, assim, a utilizar os mesmos organismos que a indústria do passado e a praticar a fermentação descontínua, não agitada e a baixa temperatura, à excepção da capacidade e geometria dos fermentadores que evoluiu.

Várias metodologias analíticas têm sido aplicadas ao estudo da fermentação, nomeadamente, cromatografia líquida, espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massa, cromatografia gasosa e mais, recentemente por “Membrane Inlet Mass Spectrometry” (MIMS), que é um método específico e sensível para a análise de compostos orgânicos voláteis em amostras líquidas e gasosas (Tarkiainen *et al.*, 2005). Mas estas técnicas são limitadas a certos grupos de compostos e necessitam de um pré-tratamento da amostra, o que por vezes é moroso. Deste modo, torna-se imperioso, estudar métodos alternativos que possam dar respostas mais rápidas.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear já mostrou potencial na caracterização química de cerveja (Lachenmeier *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2004 e Gil *et al.*, 2003). Como tal, o objectivo principal deste capítulo é estudar a potencialidade desta técnica na indústria cervejeira, nomeadamente, no controlo de qualidade das várias fases da produção.

São apresentados os resultados preliminares da aplicação do RMN, associado à quimiometria, ao estudo do processo de fabrico de cerveja. Em trabalhos futuros será necessário expandir esta análise a vários métodos de fabrico e a vários tipos de cerveja.

6.2 Materiais e Métodos

Amostras: Diferentes tipos de amostras foram recolhidos ao longo do processo de fabrico de uma cerveja “lager”, de acordo com a Tabela 6.1.

Tabela 6.1 Informação sobre as amostras analisadas.

Amostra	Etapa	pH
1	Empastagem do Malte	5,72
2	Empastagem com Gritz	5,83
3	Caldeira de sacarificação	5,51
4	Início de ebulição	5,34
5	Fim de ebulição	5,12
6	Início de fermentação	4,63
7	Fim de fermentação	4,69
8	Cerveja Filtrada	4,54

As amostras com mais resíduos sólidos foram centrifugadas a 20000 rpm, durante 15 min. a 10°C e depois filtradas antes da análise por espectroscopia de RMN (*e.g.* amostras 1, 2 e 3). As amostras 4, 5 e 6 foram apenas filtradas, enquanto que as amostras 7 e 8 foram desgaseificadas, num banho ultra-sónico, durante 10 min.

Métodos: Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos num espectrómetro Bruker Avance DRX-500, operando a 500,13 MHz para o protão e usando o programa de pulsos ‘zgpr’, com saturação do sinal da água (4,77 ppm). Para as amostras 7 e 8 também se adquiriram espectros de RMN de ^1H , usando o programa de pulsos ‘noesypr1dsp’, com saturação dos sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,64 ppm), uma vez que estas amostras continham elevadas quantidades de etanol. Foram usados 128 varrimentos e 32K pontos, com uma largura espectral de 8012 Hz. Em todas as amostras foi adicionada uma solução de 10% de D_2O e 0,02% de TSP como referência de desvio químico e de intensidade.

Para a Análise em Componentes Principais (PCA) foram construídas matrizes dos espectros das amostras, referentes às 3 regiões do espectro – alifática (3,1 – 0,5 ppm); açúcares (5,8 – 3,1 ppm) e aromática (10 – 5,8 ppm). Estas matrizes foram comprimidas (esta compressão de variáveis consiste na integração e consequente redução do número de pontos do espectro - Holmes *et al.*, 1998a,b), para eliminar os pequenos desvios e consequentes efeitos do tipo de primeira derivada, normalizadas e tratadas usando um “software” estatístico co-desenvolvido pela Universidade de Aveiro e o “Institut National Agronomique Paris-Grignon” (Barros, 1999). O objectivo desta abordagem é o mesmo da aplicação de valores superiores de LB aos espectros. No entanto é muito mais rápida, pois não é preciso processar os espectros com diferentes valores de LB. Também evita erros de processamento atribuídos à calibração, linha de base e fase, relacionados com o operador.

6.3 Análise dos Dados de Espectroscopia de RMN

É de notar que algumas das amostras estudadas são extremamente instáveis, uma vez que os processos bioquímicos continuam a ocorrer depois da amostragem. É o caso das amostras 1, 2, 3, 4 e 6. No entanto, e dado que este estudo é ainda preliminar, analisaram-se todas as amostras para ter uma ideia do tipo de compostos que caracteriza o espectro de cada fase do processo de fabrico. Numa abordagem futura, será necessário fazer uma recolha ao longo do tempo, em cada uma das etapas para se poder caracterizar adequadamente a evolução da composição química em cada fase.

Na Figura 6.1 está representada a Região Alifática (0,5 – 3,1 ppm) dos espectros de RMN de ^1H das várias amostras recolhidas ao longo do processo de fabrico da cerveja.

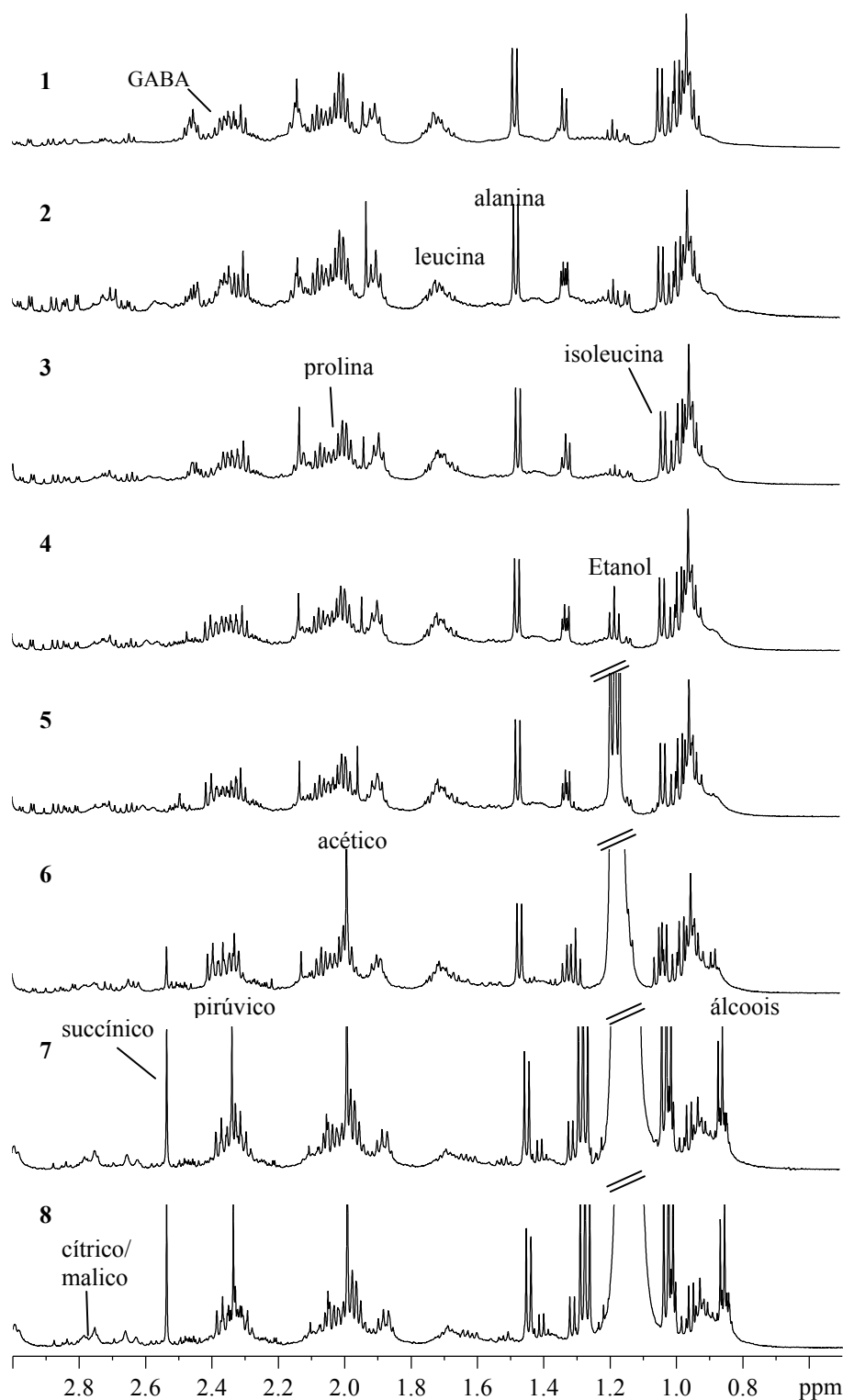


Figura 6.1 Região alifática dos espectros de RMN de ^1H de amostras do processo de fabrico da cerveja.

Nas primeiras etapas do processamento é de notar uma maior quantidade de aminoácidos, provenientes da hidrólise enzimática das proteínas do malte, que vão ser, posteriormente, metabolizados pela levedura. A partir da etapa 5 (fim da ebulição) já se começa a notar o sinal do etanol e no início da fermentação (6) já se destaca o sinal do ácido acético. A amostra 7 apresenta um maior teor de ácidos orgânicos (acético, pirúvico e succínico), resultantes do metabolismo dos açúcares (Ciclo de Krebs). É de notar ainda o elevado teor em etanol (sinal a 1,17 ppm), proveniente da fermentação. Os espectros das amostras 7 e 8 são muito semelhantes uma vez que só se procedeu à filtração da amostra.

Se tivesse sido possível considerar a análise de espectros 2D (TOCSY, HSQC e *J*-Resolved) haveria certamente mais informação a relatar, pois como se poder ver na figura, existem vários compostos minoritários (não identificáveis) que variam ao longo do processo de fabrico.

Para complementar e confirmar os resultados anteriores aplicou-se a PCA à matriz construída a partir da região alifática dos espectros de RMN de ^1H das várias amostras recolhidas ao longo do processo de fabrico da cerveja, retirando a região do etanol. Esta matriz foi comprimida, por integração de 61 pontos sucessivos, de modo a ficar com 255 pontos (desvios químicos). Na Figura 6.2 pode-se observar as coordenadas factoriais respeitantes aos primeiros componentes principais. No PC1 negativo aparecem as amostras iniciais (1-5), enquanto que no PC1 positivo se encontram as amostras, 6, 7 e 8 ou seja, desde o início da fermentação até à cerveja final filtrada.

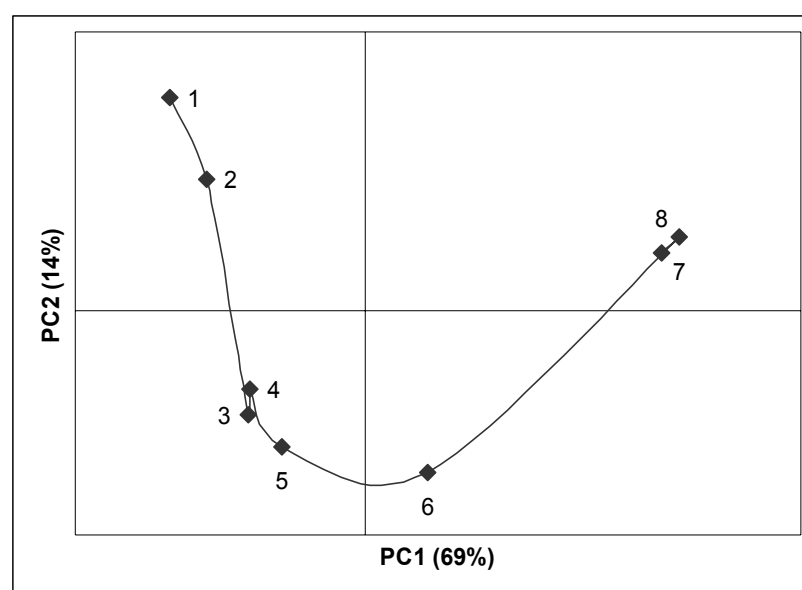


Figura 6.2 Coordenadas factoriais de PC1 vs. PC2 da análise da região alifática.

O gráfico das contribuições factoriais de PC1 (Figura 6.3) mostra que as contribuições positivas são devidas, principalmente aos ácidos orgânicos, nomeadamente ácido succínico, pirúvico, acético, cítrico e málico, e à isoleucina. Assim, as amostras finais (6, 7 e 8), tal como era de esperar, apresentam maiores teores destes compostos, uma vez que eles são produtos do metabolismo das leveduras (Campos, 1998). Também se observa, perfeitamente, que a amostra 6 (início da fermentação) é a que apresenta os menores teores, pois tem um valor de PC1 mais baixo, em relação às amostras 7 e 8.

Em relação às amostras iniciais, localizadas na parte negativa do eixo de PC1, pode-se dizer que têm maior teor de aminoácidos, tais como, alanina, leucina, GABA e prolina. Tal facto era esperado, uma vez que a levedura ainda não começou a metabolizar os nutrientes disponíveis, não consumindo, portanto, os aminoácidos presentes no meio, provenientes da hidrólise enzimática das proteínas do malte.

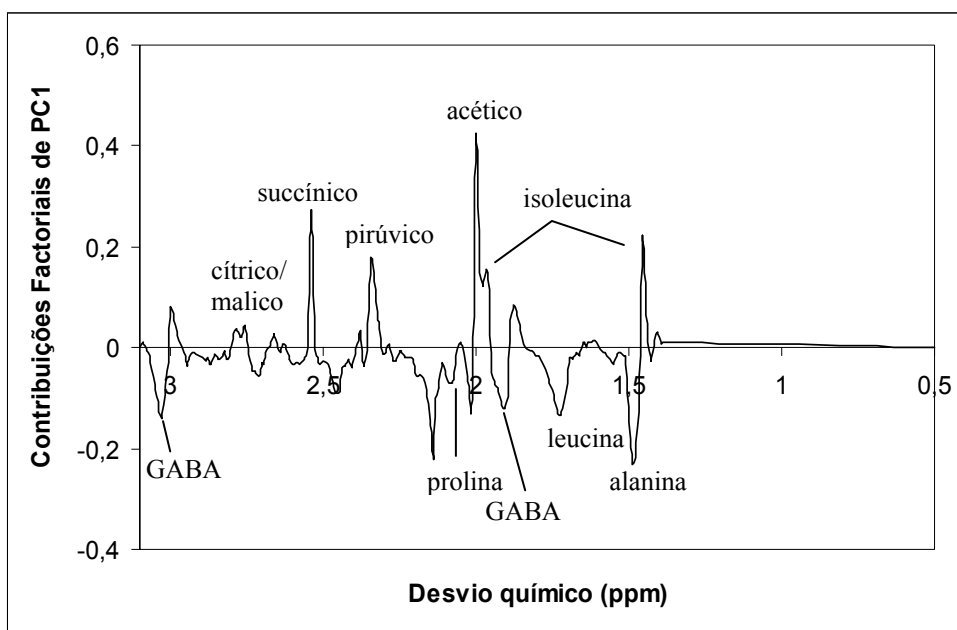


Figura 6.3 Contribuições factoriais de PC1.

Na Figura 6.4 pode-se observar os espectros de RMN de ^1H das 2 amostras com maior diferença em termos de composição química (1 - empastagem do malte e 7 - fim da fermentação) e assim confirmar os resultados da PCA. A amostra 1 é mais rica em aminoácidos enquanto que a amostra 7 apresenta teores mais elevados de ácidos orgânicos e etanol.

Face ao número reduzido das amostras estudadas, a aplicação da PCA tem um interesse relativo, pois a informação que se retira também é facilmente detectada pela análise dos espectros. No entanto, e dado que esta técnica é exploratória, pode permitir analisar um maior número de espectros, num curto espaço de tempo e assim facilitar o controlo do processo de fabrico.

Depois se serem analisadas mais amostras, em diversas fases do processo e ao longo do tempo, este método pode permitir a identificação concreta do passo do processo de fabrico em que determinada amostra se encontra e assim, a optimização das condições de processamento, de modo a tornar mais rentável e mais fiável o fabrico de cerveja.

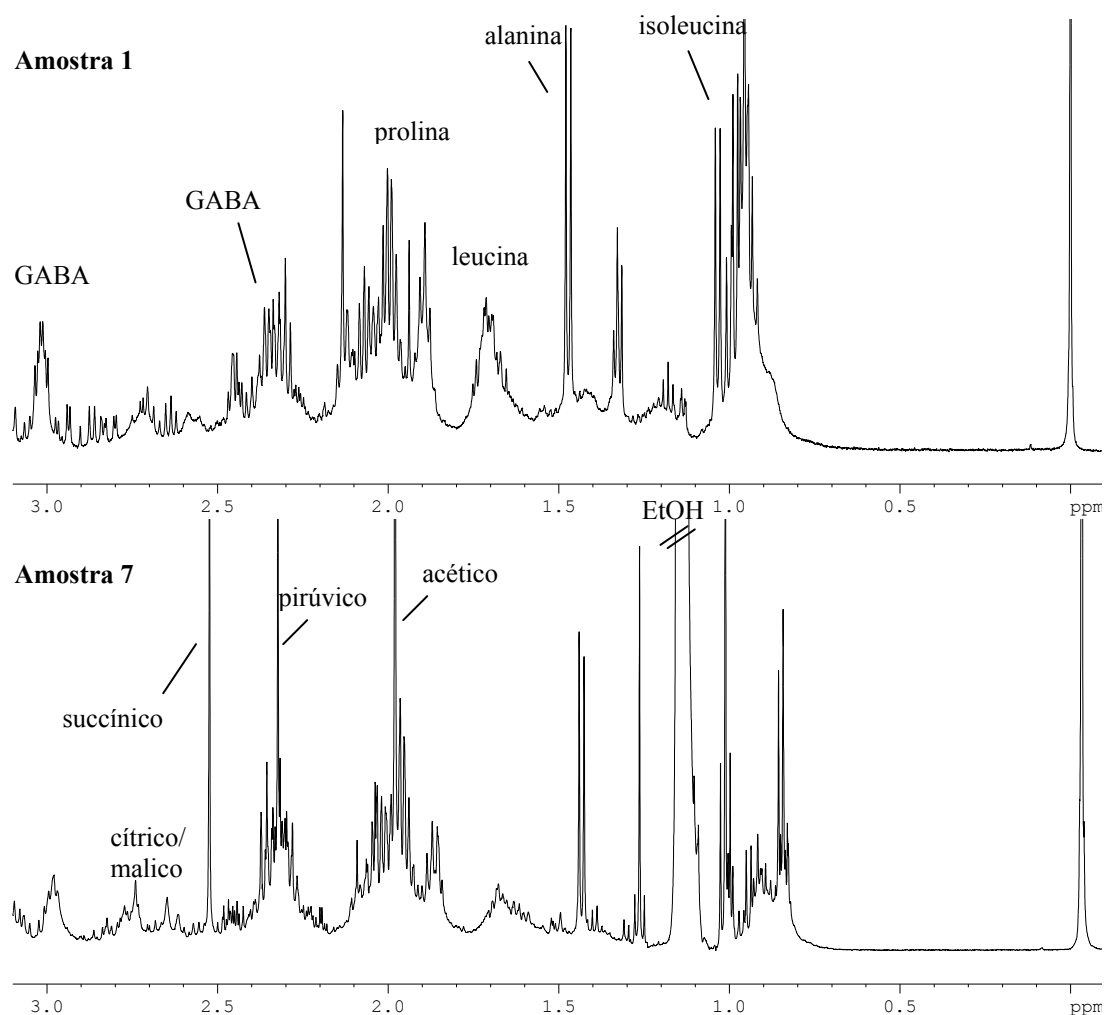


Figura 6.4 Espectros de RMN de ^1H das amostras 1 (empastagem do malte) e 7 (fim da fermentação).

Nos espectros da Região dos Açúcares (3,1-5,8 ppm), representados na Figura 6.5, pode-se observar que a principal diferença reside na quantidade e tipo de açúcares.

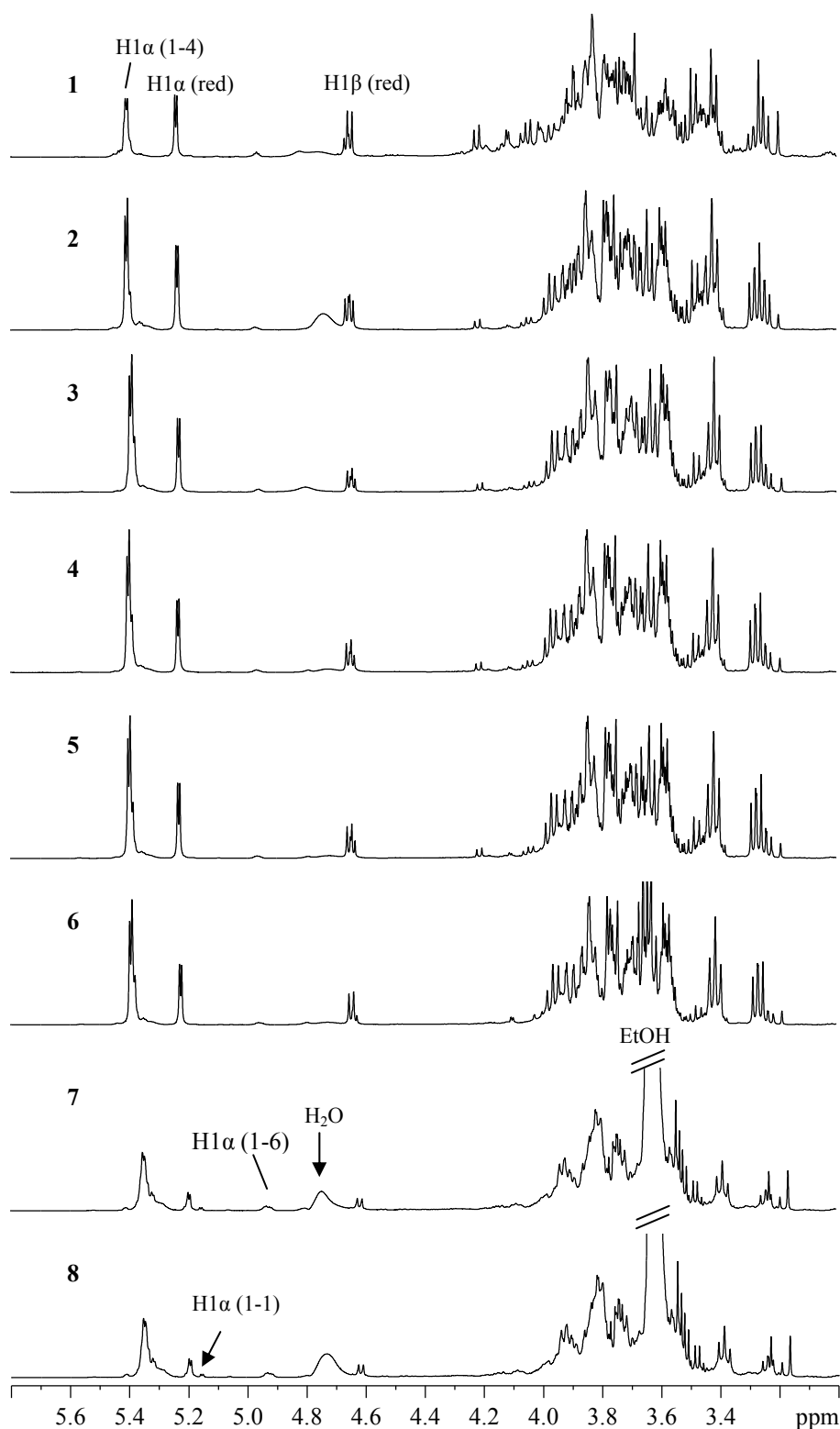


Figura 6.5 Região dos açúcares dos espectros de RMN de ^1H das várias amostras do processo de fabrico da cerveja.

Assim, na amostra inicial, a quantidade de açúcares simples é muito mais elevada, pois os sinais dos prótons redutores são mais abundantes (H1 α red e H1 β red). Estes açúcares, tal como vimos na introdução geral, provêm da hidrólise enzimática dos grânulos de amido, que ocorre durante o processo da maltagem. Por sua vez, durante o processo de fermentação, a levedura consome os aminoácidos e os açúcares simples do mosto para produzir dióxido de carbono e etanol, e por isso, no final do processo, os açúcares que permanecem em maior quantidade, são os açúcares mais ramificados, nomeadamente dextrinas, que não foram metabolizadas pela levedura (Hughes e Baxter, 2001). Estes compostos apresentam sinais mais largos a 3,7-4,0 ppm e a 5,3-5,4 ppm, como se pode ver nos espectros das amostras 7 e 8.

Tal como na região anterior, a PCA foi aplicada à região dos açúcares comprimida, por integração de 59 pontos sucessivos, de modo a ficar com 250 desvios químicos, retirando os sinais da água e do etanol. Na Figura 6.6 estão representadas as coordenadas factoriais de PC1 vs. PC2 da análise da região dos açúcares. Novamente, as amostras 7 e 8 estão separadas das restantes, o que já era de esperar, uma vez que são amostras recolhidas após a fermentação, cuja composição em açúcares é totalmente diferente da inicial.

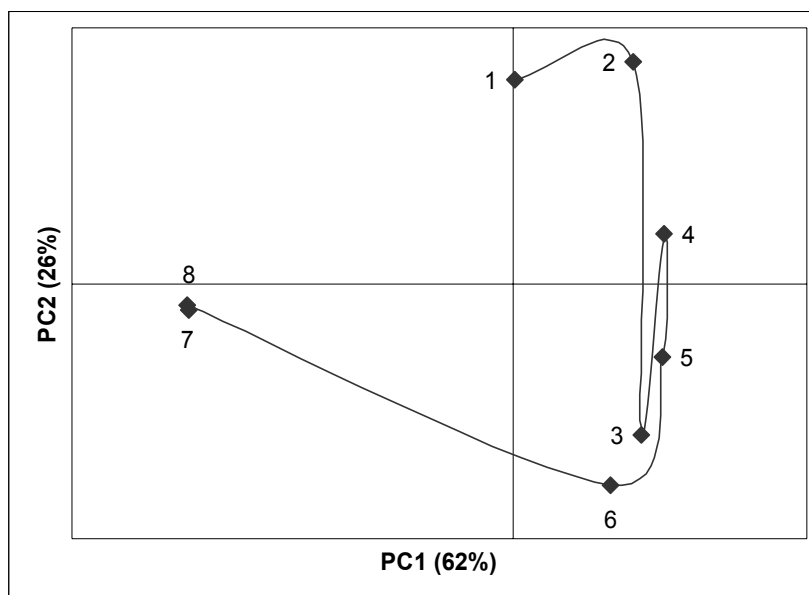


Figura 6.6 Coordenadas factoriais de PC1 vs. PC2 da análise da região dos açúcares.

A análise do gráfico das contribuições factoriais de PC1 (Figura 6.7) revela que os sinais positivos advêm da contribuição de protões anoméricos ($H1\alpha$ red e $H1\beta$ red), característicos dos açúcares simples, mono e dissacarídeos, o que demonstra o elevado teor destes açúcares antes do início da fermentação. Em contrapartida, os sinais negativos, característicos das amostras 7 e 8, são devidos a picos que advêm de ligações $H1\alpha$ (1-4) e $H1\alpha$ (1-6), responsáveis pelas ramificações dos açúcares. Estes açúcares permanecem na cerveja pois não conseguem ser metabolizados pela levedura (Hughes e Baxter, 2001; Campos, 1998).

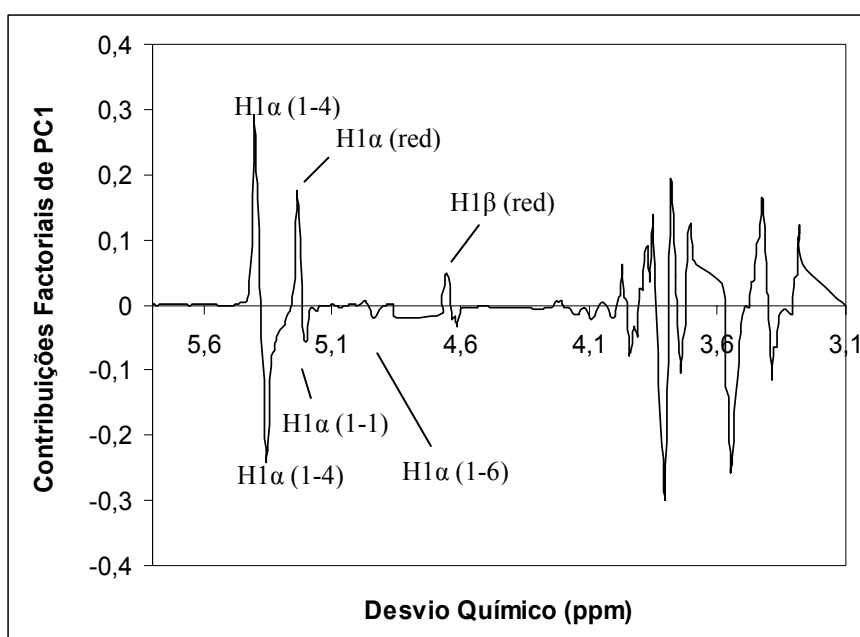


Figura 6.7 Contribuições factoriais de PC1.

Na Figura 6.8 podemos observar os espectros de RMN de 1H das 2 amostras com maior diferença em termos de composição química (1 - empastagem do malte e 7 - fim da fermentação) e assim confirmar os resultados da PCA. A amostra 1 é mais rica em açúcares simples fermentáveis, enquanto que a amostra 7 apresenta teores mais elevados de açúcares maiores e ramificados, como é o caso das dextrinas.

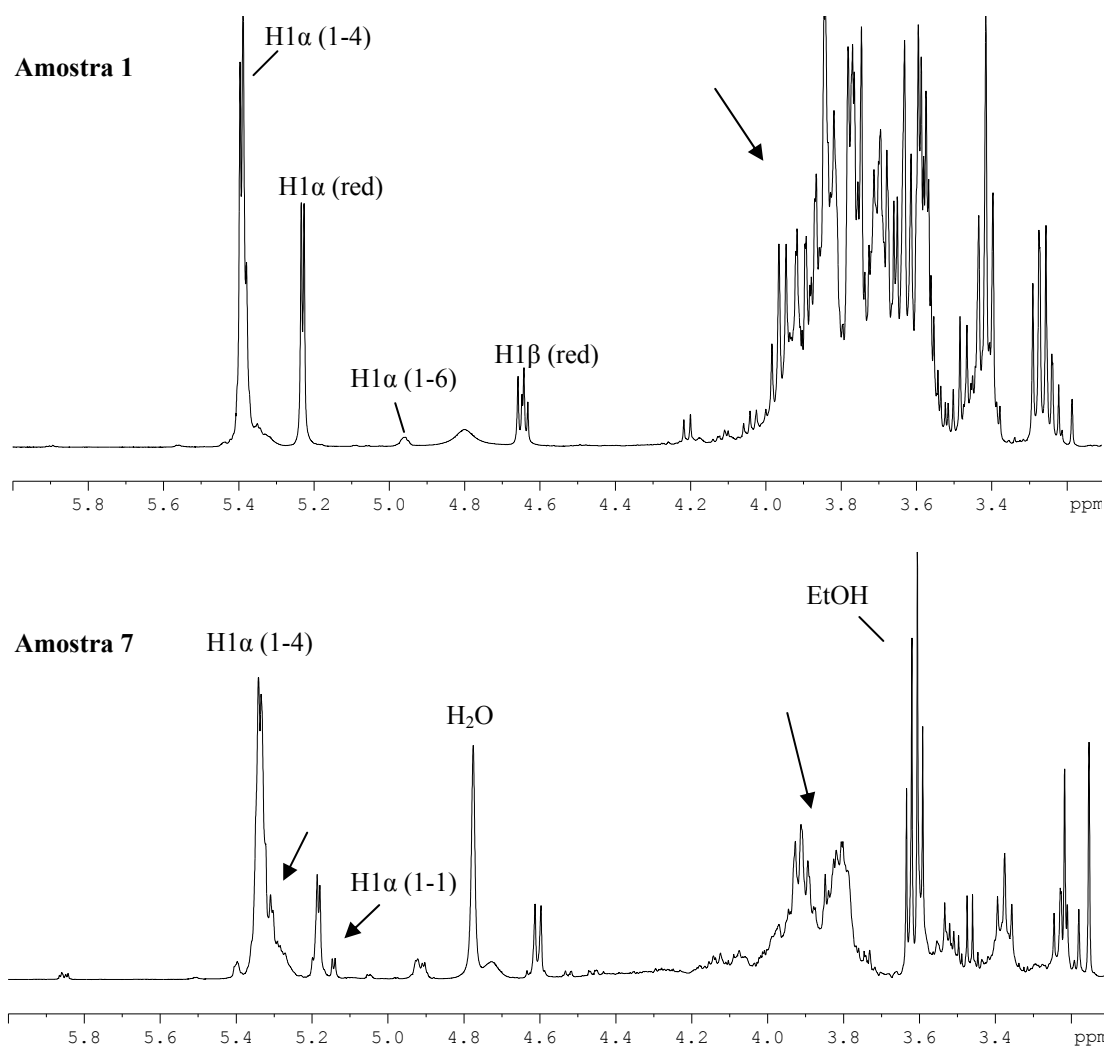


Figura 6.8 Espectros de RMN de ¹H das amostras 1 (empastagem do malte) e 7 (fim da fermentação).

Na Figura 6.9 estão apresentados os espectros da Região Aromática (5.8-10 ppm) das amostras do processo de fabrico da cerveja. Como se pode ver, os espectros das amostras iniciais são mais simples, revelando o baixo teor em compostos aromáticos. Estes compostos são resultantes de várias etapas do processamento. Por exemplo, os álcoois aromáticos superiores são produzidos pelo metabolismo secundário das leveduras na degradação dos aminoácidos. Assim, a degradação da fenilalanina e da tirosina dão origem ao feniletanol e ao tirosol, respectivamente (Hughes e Baxter, 2001).

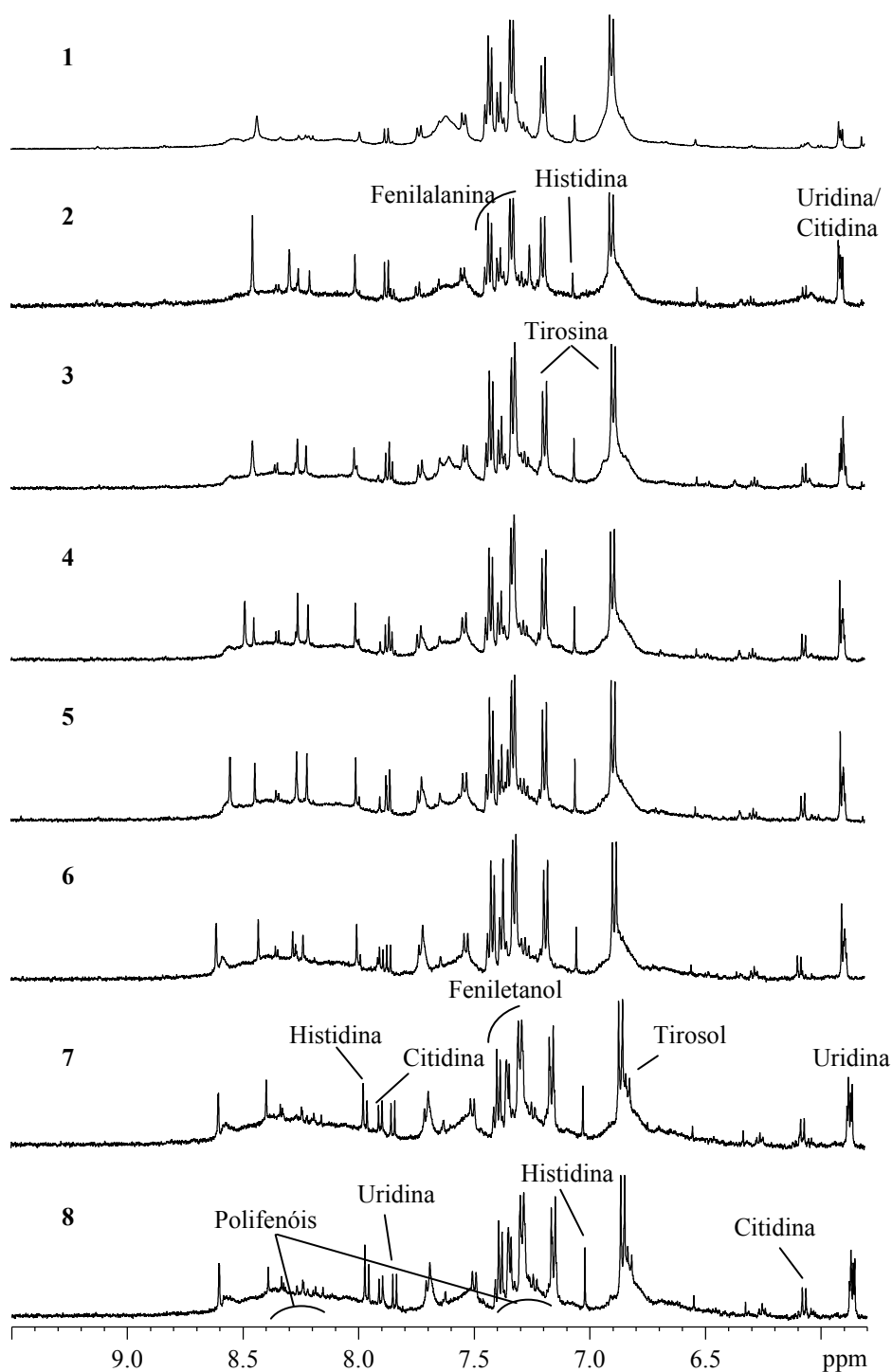


Figura 6.9 Região aromática dos espectros de RMN de ^1H das várias amostras do processo de fabrico da cerveja.

É de notar a maior quantidade de aminoácidos (tirosina, fenilalanina e histidina) nas amostras iniciais e a presença de polifenóis e nucleósidos (uridina, citidina, adenosina) nas

amostras finais. A biossíntese destes compostos pode utilizar o dióxido de carbono formado no ciclo de Krebs (Weil, 2000).

A Figura 6.10 representa o resultado da aplicação da PCA à matriz da região aromática dos espectros das amostras em causa, reduzida por integração de 98 pontos consecutivos, de modo a ficar com 250 pontos. Com base no PC1 pode-se explicar uma grande parte da variabilidade (75 %). As amostras 7 e 8 continuam separadas das restantes, mostrando que, realmente, a sua composição aromática é bastante diferente das amostras iniciais. Este facto deve-se, mais uma vez, ao metabolismo das leveduras, que produzem compostos aromáticos, que contribuem para o sabor e aroma da cerveja. Assim, o tipo de levedura usado é determinante para as características sensoriais da cerveja (Hughes e Baxter, 2001). Também existem etapas do processo de fabrico, que devido às condições a que o mosto é submetido, contribuem para a produção de compostos aromáticos a partir da degradação de outros compostos produzidos em etapas iniciais.

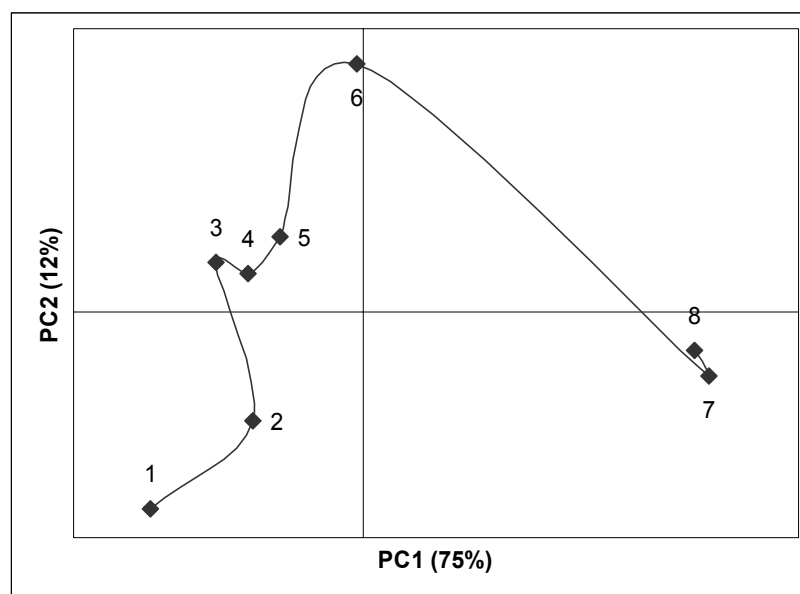


Figura 6.10 Coordenadas factoriais de PC1 vs. PC2 da análise da região aromática.

A análise do gráfico das contribuições factoriais (Figura 6.11), mostra que as amostras de 1 a 5, situadas no PC1 negativo do mapa das coordenadas factoriais, contêm teores mais elevados de citidina, tirosina e fenilalanina. Em contrapartida, as amostras 7 e 8 (situadas no eixo de PC1 positivo), apresentam teores mais elevados de tirosol, histidina, feniletanol,

uridina e polifenóis. A identificação destes compostos é dificultada, mesmo com o recurso a técnicas de RMN multidimensionais, por várias razões, nomeadamente, a baixa concentração presente na cerveja o que provoca uma fraca intensidade espectral, forte sobreposição com outros sinais e pela inerente falta de informação sobre o acoplamento escalar. Normalmente, dão origem a sinais largos no espectro por serem moléculas grandes, de elevada massa molecular. Recentemente, a espectroscopia de RMN, acoplada com a cromatografia líquida e a espectrometria de massa (LC-NMR/MS) foram aplicadas no estudo destes compostos (Gil *et al.*, 2003).

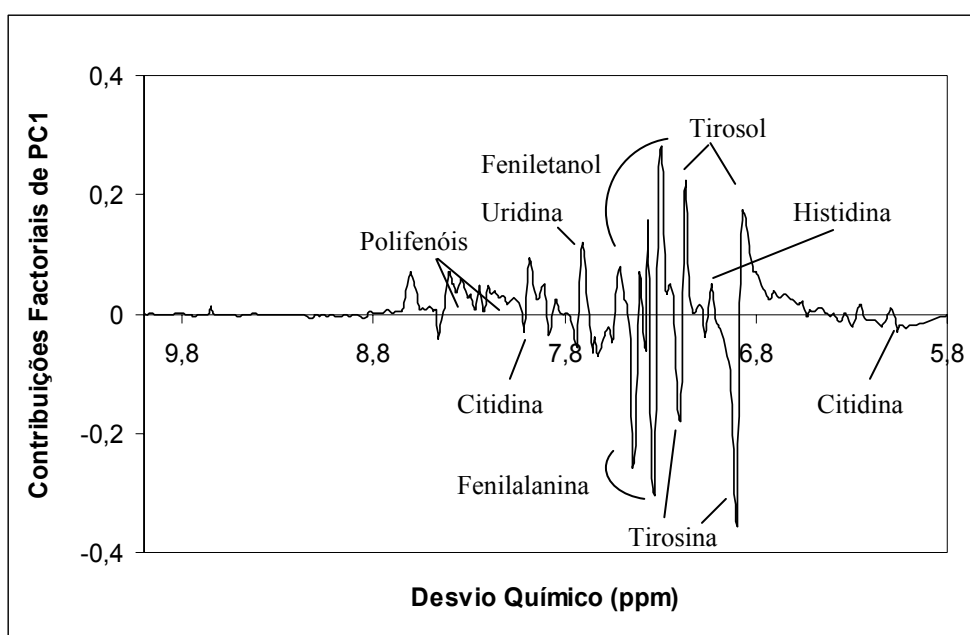


Figura 6.11 Contribuições factoriais de PC1.

Na Figura 6.12 estão apresentados os espectros, da região aromática, das amostras 1 e 7, por serem as amostras com maior diferença a nível da composição aromática. Como se pode ver, o perfil aromático da amostra 1 é muito mais simples, uma vez que ainda não ocorreu a fermentação, enquanto que o da amostra 7 apresenta muito mais compostos, nomeadamente polifenóis, nucleósidos e álcoois, confirmando assim os resultados da PCA.

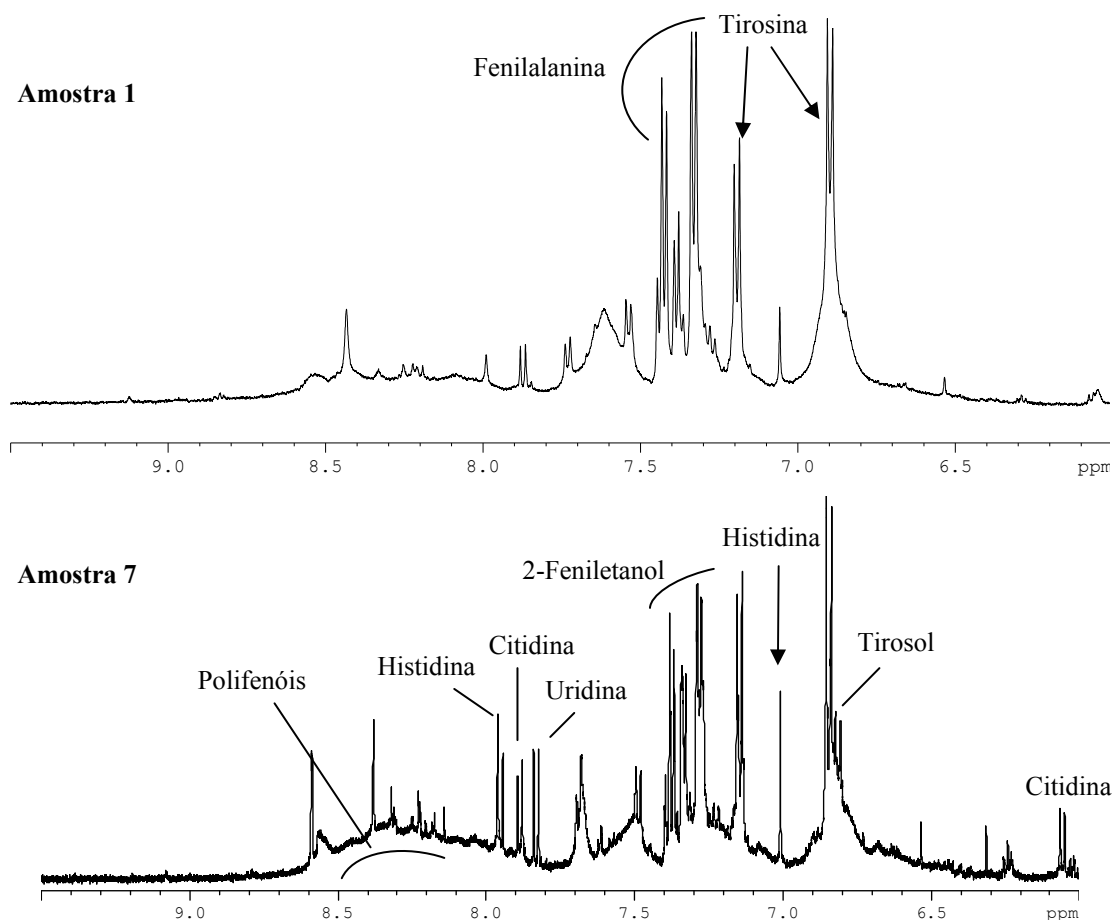


Figura 6.12 Espectros de RMN de ^1H das amostras 1 (empastagem do malte) e 7 (fim da fermentação).

6.4 Conclusões

Em primeiro lugar, este estudo permitiu demonstrar que a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, associada a métodos quimiométricos, pode ter aplicabilidade no controlo de qualidade do processo de fabrico da cerveja. Assim, é possível acompanhar a composição química do mosto ao longo das várias etapas e detectar eventuais anomalias. O controlo efectivo do processo permite a optimização das condições de fabrico com vista à rentabilização e à qualidade e segurança do produto final. No entanto, para a técnica ter maior aplicabilidade e fiabilidade é necessário ajustar o modo de quantificação dos

diferentes compostos, objecto de estudo de trabalhos futuros. Feito isto, as vantagens poderão passar pela elevada rapidez de aquisição de resultados, uma vez que se conseguem quantificar, em simultâneo, vários compostos, pertencentes a diferentes famílias, sem qualquer tipo de pré-tratamento da amostra e usando uma quantidade reduzida.

O pré-tratamento estatístico usado na compressão das matrizes, antes da análise por PCA poderá apresentar vantagens, em relação ao processamento dos espectros com diferentes valores de LB, usado nos capítulos anteriores. Assim, a simplicidade e rapidez com que se obtêm as matrizes contribui para a elevada potencialidade desta técnica na aplicabilidade na indústria cervejeira. A possibilidade de ocorrerem erros relacionados com o operador é diminuta, uma vez que a sua intervenção é reduzida, unicamente, aos espectros iniciais, adquiridos pelo espectrómetro.

O facto de ser possível obter resultados fiáveis usando a abordagem de integração de pontos sucessivos, que simulam os espectros obtidos em espectrómetros de campo mais baixo, significa que a perda de informação não é significativa. Isto poderá sugerir que a utilização de espectrómetros de campo mais reduzido (*e.g.*: 300 MHz), no controlo de qualidade da cerveja, terá potencialidade futura, o que é de extrema importância, uma vez que os custos associados são extremamente mais baixos. No entanto, e como já foi referenciado, este trabalho necessita de mais desenvolvimentos e confirmações.

Referências

Barros, A.S. – “Contribution à la selection et la comparaison de variables caractéristiques” – *Ph.D. Thesis*; Institut National Agronomique Paris-Grignon; France; 1999.

Campos, L.S. – “Entender a Bioquímica – o metabolismo fundamental em animais e plantas”; Escolar Editora; Lisboa; 1998.

Duarte, I.; Barros, A.; Belton, P.; Righelato, R.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Gil, A. – “High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the

Characterization of Beer” – Journal of Agricultural and Food Chemistry; 50; 2475-2481; 2002.

Duarte, I.; Godejohann, M.; Braumann, U.; Spraul, M.; Gil, A. – “Application of NMR Spectroscopy and LC-NMR/MS to the Identification of Carbohydrates in Beer” – Journal of Agricultural and Food Chemistry; 51; 4847-4852; 2003.

Duarte, I.; Barros, A.; Almeida, C.; Spraul, M.; Gil, A. – “Multivariate Analysis of NMR and FT-IR Data as a Potential Tool for the Quality of Beer” – Journal of Agricultural and Food Chemistry; 52; 1031-1038; 2004.

Gil, A.; Duarte, I., Godejohann, M.; Braumann, U.; Maraschin, M.; Spraul, M. – “Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection” – Analytica Chimica Acta; 488; 35-51; 2003.

Holmes, E.; Nicholls, A. W.; Lindon, J. C.; Ramos, S.; Spraul, M.; Neidig, P.; Connor, S. C.; Connelly, J.; Damment, S. J. P.; Haselden, J. and Nicholson, J. K. – “Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ^1H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition” – NMR in Biomedicine; 11; 235–244; 1998.

Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Nicholls, A. W.; Lindon, J. C.; Connor, S. C.; Polley, S.; Connelly, J. – “The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine” - Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems; 44; 245–255; 1998.

Hughes, P.S.; Baxter, E.D. – “Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects” – The Royal Society of Chemistry; Cambridge; 2001.

Lachenmeier, D. W.; Frank, W.; Humpfer, E.; Schafer, H.; Keller, S.; Mortter, M.; Spraul, M. – “Quality Control of Beer using High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance

Spectroscopy and Multivariate Analysis” – European Food Research and Technology; 220; 215-221; 2005.

Tarkiainen, V.; Kotiaho, T.; Mattila, I.; Virkajarvi, I.; Aristidou, A.; Ketola, R. – “One-line monitoanel of continuous beer fermentation process using automatic membrane inlet spectrometric system” – Talanta; 65; 1254-1263; 2005.

Weil, J. H. – “Bioquímica Geral” – 2ª edição; Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa; 2000.

7 CONCLUSÕES FINAIS E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

O potencial de técnicas espectroscópicas, como o FT-IR e o RMN, no estudo da cerveja foi explorado nesta dissertação. Verificou-se que a espectroscopia de FT-IR permitiu a separação de algumas cervejas, produzidas em diferentes países, essencialmente com base nos teores relativos de etanol e de dextrinas. Esta técnica simples, apenas permite detectar bandas características das famílias dos compostos e pode ter um potencial elevado, quando os seus dados são complementados com dados de outras técnicas. Como tal, o objecto de trabalhos futuros será aplicar métodos estatísticos, nomeadamente OPA (“outer product analysis”) a espectros de FT-IR e RMN. A espectroscopia de RMN possibilita a aquisição de elevada quantidade de informação, mas é uma técnica cara, que necessita de mão-de-obra especializada e elevados custos de manutenção. Assim, se for possível combinar as duas técnicas, de modo a extrair o máximo de informação do RMN e aplicá-la à informação do FT-IR, as indústrias poderão usar a técnica mais barata e mais simples, o FT-IR, com resultados semelhantes aos obtidos por RMN. No entanto, esta é uma tarefa árdua, que necessita de grande investigação.

Por seu lado, a espectroscopia de RMN, em conjunto com a Análise em Componentes Principais, pode ter aplicabilidade no controlo de qualidade da cerveja, nomeadamente distinguir entre locais e datas de produção, com base nos teores de alguns compostos. Foi possível detectar diferenças na composição química de cervejas do mesmo tipo e marca, produzidas em diferentes países, mostrando que poderá haver diferenças para uma mesma marca de cerveja. As diferenças podem estar relacionadas com a qualidade da água, com a variedade das matérias-primas, com o clima e mesmo com pequenas variações no equipamento.

No capítulo 5 foi feito um estudo semelhante mas, usando cervejas produzidas no mesmo país, porém em locais/cidades e datas diferentes. Deste modo, pretendia-se minimizar as diferenças relacionadas com a qualidade da água e restantes matérias-primas e condições climáticas. Mesmo assim, a espectroscopia de RMN e a PCA conseguiram detectar pequenas diferenças na composição química, que podem ser relacionadas, principalmente com as condições de processamento, nomeadamente, tipo de equipamento, temperatura,

estado da levedura e condições de armazenamento. No entanto, será necessário continuar estes estudos, usando um maior número de cervejas, de diferentes tipos e/ou marcas, recolhidas ao longo do tempo.

Como se sabe, os desvios químicos dos espectros de RMN são extremamente sensíveis a variações de pH e, quando se aplica a Análise em Componentes Principais, essas pequenas diferenças são detectadas. Para eliminar esses efeitos e ressaltar somente as diferenças relacionadas com a composição química, é necessário alinhar os espectros. Neste trabalho foram usados dois métodos diferentes com resultados semelhantes: o processamento dos espectros com valores superiores de LB e a compressão de variáveis. Ambos alargam os sinais, diminuindo a resolução espectral. No entanto, e como se viu, é possível obter resultados interessantes, sugerindo que a utilização de espectrómetros de campo mais baixo poderá ter aplicabilidade no estudo da cerveja, o que é de extrema importância, uma vez que os custos associados são menores.

No futuro poderá ser interessante investigar a adição de um tampão às amostras de cerveja, de modo a uniformizar os valores de pH e assim diminuir os efeitos do tipo de primeira derivada na análise por PCA. Esta metodologia poderá dispensar o alinhamento dos espectros, o que trará vantagens em termos de tempo dispendido e em termos de resolução, que será mantida.

Apesar dos processos bioquímicos, que ocorrem no fabrico da cerveja, estarem bastante elucidados, com o avançar da tecnologia, torna-se imperioso explorar novas técnicas de análise de cerveja e mosto que permitam controlar a qualidade de uma maneira mais segura, rápida e eficaz. A espectroscopia de RMN já tinha mostrado potencial em trabalhos anteriores e foi aplicada a diferentes amostras recolhidas ao longo do processo de fabrico de uma cerveja. Foi possível seguir as alterações na composição química do mosto, resultantes das transformações físicas e bioquímicas. No entanto, este estudo ainda é preliminar e é necessário analisar mais amostras, ao longo do tempo e de diferentes tipos de cerveja.

Poderá ser interessante seguir o processo de fermentação de uma cerveja por espectroscopia de RMN, nomeadamente identificar e controlar as alterações bioquímicas que ocorrem, e relacioná-las com as características sensoriais da cerveja final. Este estudo

poderá proporcionar um controlo mais efectivo do processo, permitindo a optimização das condições de fabrico, com vista à rentabilização, à qualidade do produto final e ao desenvolvimento de novos produtos.

Em suma, os resultados obtidos abrem a possibilidade da espectroscopia de RMN, associada a métodos quimiométricos, ser aplicada no controlo de qualidade da cerveja, nomeadamente de forma a fornecer informações, tais como, o local e data de fabrico e a qualidade de matérias primas e condições de processamento.